

**Molekulartoxikologische Untersuchungen zu
Mechanismen der Toxizität
von 2-Alkylcyclobutanonen in humanen Kolonepithelzellen**



seit 1558

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. troph. Nadine Knoll
geboren am 18. Januar 1978 in Zeulenroda

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Michael Glei
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Dornburger Straße 25
07743 Jena
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. / med. habil. Thomas Liehr
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Humangenetik
Kollegiengasse 10
07743 Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andrea Hartwig
Technische Universität Berlin
Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie
Skr. TIB 4/3-1
Gustav-Meyer-Allee 25
13355 Berlin

Tag der Disputation: 27. April 2010

Wenn du eine weise Antwort verlangst,
musst du vernünftig fragen.

Johann Wolfgang von Goethe
(dt. Schriftsteller; 1749-1832)

ABSTRACT

The irradiation of fat-containing food like meat, eggs, crustaceans or several fruits results in the formation of 2-alkylcyclobutanones (2ACB), cyclic derivatives from common fatty acids. Because they do not occur in unirradiated food and hence they develop due to irradiation, 2ACB are classified as food contaminants, the toxicological relevance of which had been demonstrated already. High doses of 2ACB lead to DNA damage in studies with human colon cells and advanced the growth of colon tumours in rats. To elucidate the underlying mechanisms of genotoxicity this work investigated the molecular-toxicological characteristics of common 2ACB, namely *2-dodecyl-* (2dDCB), *2-tetradecyl-* 2(tDCB), *2-tetradecenylcyclobutanone* (2tDeCB) and *4-tetradecyl- γ -butyrolactone* (4tDBL). The relative sensitivities of human colon cells, representing different stages of tumour development (HT29clone19A, LT97 adenoma cells) and healthy primary human colon epithelial cells were explored. Therefore the cells were exposed to 2dDCB, 2tDCB, 2tDeCB (150-2097 μ M) and 4tDBL (150-1260 μ M). To define acute cytotoxic effects (absolute cell numbers and viability) the trypan blue exclusion method was used after 30, 60, 90 and 120 minutes after treatment with cyclobutanones. Genotoxicity, reflected as strand breaks, was assessed using the alkaline version of the comet assay (30 minutes, 37°). Moreover also chromosomal changes and *TP53* gene mutations were investigated by 24-color-FISH and 2-color-FISH respectively, in LT97 adenoma cells.

While the tested 2ACB concentrations in LT97 adenoma cells and in freshly isolated primary cells were more cytotoxic in a time- than in a dose-dependent manner, in the human colon tumour cell line no cytotoxic effects were observed. Associated with this was a marked induction of DNA damage by 2dDCB, 2tDCB and 2tDeCB in LT97 adenoma cells and in freshly isolated colonocytes but not in the HT29clone19A cells detectable. 2dDCB turned out to have the highest cyto- and genotoxic potential in primary human colon cells. Therefore lower concentrations of 2dDCB (30, 75, 150 μ M) were used, to investigate the clastogenic potential in LT97 adenoma cells after the incubation time was extended to 6 hours. The cytogenetic studies revealed that the treatment of metabolic active cells with 2dDCB leads to enhanced numbers of aberrant metaphases within the cell population showing a wide range of different mutations like isochromosomes, deletions and translocations. These effects were most pronounced after treating cells with 150 μ M 2dDCB. This concentration dependent increase of chromosomal damage is also apparent when regarding only chromosomes 5, 12, and 17 that harbour the tumour-related target genes *APC*, *KRAS* and *TP53* respectively.

In conclusion by combining 24-color FISH with the OECD-guideline 473 for testing mutagenicity it was possible for the first time to detect the induction of chromosomal aberrations by food contaminants in human colon adenoma cells *in vitro* that may lead to new possibilities for this type of food research in the future. The present results confirm and expand the knowledge on genotoxic potential of cyclobutanones. 2ACB show a clear genotoxic potential in healthy human colon epithelial cells and in cells representing preneoplastic colon adenoma, where also cytogenetic activity could be demonstrated for 2dDCB. The findings of the presented studies contribute to closing a gap of knowledge on cyclobutanones and provide new information on their molecular-toxicological characteristics in human colon cells. Due to their properties 2ACB may be regarded as possible food related putative risk factors for colon cancer that have to be minimized. The concentrations found in irradiated food so far, representing the estimated physiological relevant concentrations in daily consumption of irradiated food are possibly too low to have significant impact on human health.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestrahlung von fetthaltigen Nahrungsmitteln wie Fleisch, Eier, Krustentiere und bestimmte Früchte führt zur Entstehung von zyklischen Triglycerid-Derivaten, den fettsäurespezifischen 2-Alkylcyclobutanonen (2ACB). Da diese in unbestrahlten Lebensmitteln nicht vorkommen und sie somit infolge der ionisierenden Bestrahlung entstehen, sind sie als Nahrungsmittelkontaminanten einzustufen, deren toxikologische Relevanz bereits gezeigt werden konnte. Sehr hohe Konzentrationen von 2ACB führten in *in vitro* Studien mit humanen Kolonzellen zur Schädigung der DNA und in Fütterungsstudien mit Ratten förderten sie das Tumorstadium. Da die zugrunde liegenden Mechanismen der Genotoxizität noch unbekannt waren, untersucht diese Arbeit die molekulartoxikologischen Eigenschaften der häufig in bestrahlten Lebensmitteln vorkommenden Cyclobutanonverbindungen *2-Dodecyl-*, *2-Tetradecyl-* und *2-Tetradecenylcyclobutanon* sowie *4-Tetradecyl- γ -Butyrolakton*. Es wurden die relativen Sensitivitäten humaner Kolonzellen unterschiedlichen Zelltransformationsgrades (HT29clone19A, LT97 Adenomzellen) und von gesunden primären humanen Kolonepithelzellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit 2dDCB, 2tDCB, 2tDeCB (150-2097 μ M) und 4tDBL (150-1260 μ M) behandelt. Die Bestimmung akuter zytotoxischer Effekte (absolute Zellzahl und Vitalität) erfolgte mittels des Trypanblau-Ausschlusstests nach 30, 60, 90 und 120 Minuten Behandlung der Zellen mit den Cyclobutanonen. Zur Beurteilung der DNA-schädigenden Wirkung wurde der alkalische Comet Test (30 min, 37°C) durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte in LT97 Adenomzellen die Untersuchung von Chromosomenveränderungen und Mutationen im *TP53*-Gen mit der 24- und 2-Farben-FISH-Technik.

Während die getesteten 2ACB-Konzentrationen in LT97 und in frisch isolierten Kolonepithelzellen vor allem in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zytotoxisch wirkten, waren in der humanen Kolontumorzelllinie HT29clone19A keine zytotoxischen Effekte zu beobachten. Gleichzeitig war eine signifikante Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 2dDCB, 2tDCB und 2tDeCB in LT97 Adenomzellen und in frisch isolierten Kolonzellen, aber nicht in HT29clone19A Zellen nachweisbar. 2dDCB erwies sich in primären Kolonzellen als am stärksten zyto- und genotoxisch. Daher wurde diese Substanz nachfolgend in geringeren Konzentrationen (30, 75, 150 μ M) eingesetzt, um nach einer auf 6 Stunden verlängerten Inkubationszeit das klastogene Potenzial in LT97 Adenomzellen zu untersuchen. Die zytogenetischen Studien zeigten, dass die Behandlung von metabolisch aktiven Zellen mit 2dDCB zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl an aberranten Metaphasekernen innerhalb

der Zellpopulation führt. In den aberranten Zellen wurde ein breites Spektrum an Chromosomenmutationen mit Isochromosomen, Deletionen und Translokationen nachgewiesen. Die häufigsten und am stärksten ausgeprägten Chromosomenveränderungen zeigten die mit 150 µM 2dDCB behandelten Zellen. Auch in den Chromosomen 5, 12 und 17, auf welchen die tumorrelevanten Zielgene *APC*, *KRAS* und *TP53* lokalisiert sind, wurden mit zunehmender Konzentration höhere Chromosomenschäden detektiert. Insgesamt konnte durch die Kombination der 24-Farben-FISH Technik mit der OECD-Richtlinie 473 zur Testung der Mutagenität zum ersten Mal die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Nahrungsmittelkontaminanten in human Kolonzellen *in vitro* nachgewiesen und so ein neuer Untersuchungsansatz für die zukünftige Ernährungsforschung präsentiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen und erweitern die Kenntnisse zum genotoxischen Potenzial von Cyclobutanonen. 2ACB weisen eine deutliche DNA-schädigende Wirkung in gesunden humanen Kolonepithelzellen und in präneoplastischen Adenomzellen, in welchen zusätzlich klastogene Effekte durch 2dDCB nachweisbar waren, auf. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen neue Informationen über die molekulartoxikologischen Eigenschaften von Cyclobutanonen in humanen Kolonzellen. Aufgrund dieser Eigenschaften sind 2ACB als mögliche ernährungsrelevante Risikofaktoren für Kolonkrebs einzustufen, die es weiterhin zu minimieren gilt. Jedoch sind die bisher in bestrahlten Lebensmitteln gefundenen und daher infolge eines täglichen Verzehrs zu erwartenden (physiologischen) Konzentrationen wahrscheinlich zu gering, um sich gesundheitsschädigend auszuwirken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. <i>Bestrahlung in der Lebensmittelindustrie - Bedeutung für den Endverbraucher</i>	<i>1</i>
1.1.1. Verarbeitung von Lebensmitteln	1
1.1.2. Lebensmittelbestrahlung	2
1.1.3. Entwicklung und Anwendung der Technologie	3
1.2. <i>Veränderung von Lebensmittelinhaltsstoffen durch ionisierende Strahlen</i>	<i>6</i>
1.2.1. 2-Alkylcyclobutanone: Entstehung und Vorkommen	7
1.2.2. Toxikologie der 2-Alkylcyclobutanone	7
1.2.3. Metabolisierung der Cyclobutanonverbindungen - Stand der Wissenschaft	10
1.3. <i>Kolonkarzinogenese</i>	<i>12</i>
1.3.1. Molekulargenetische Grundlagen der Kanzerogenese	12
1.3.2. Das Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese	13
1.3.3. Risikofaktoren für Dickdarmkrebs	15
1.4. <i>Molekular-Zytogenetische Verfahren zur Chromosomenanalyse</i>	<i>17</i>
1.4.1. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	18
1.4.2. 24-Farben-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Multicolor-, Multiplex-FISH)	19
1.5. <i>Ziele und Aufgabenstellung</i>	<i>21</i>
2. Methoden	23
2.1. <i>Verwendete Zelllinien</i>	<i>23</i>
2.2. <i>Primäre Kolonzellen</i>	<i>24</i>
2.3. <i>Charakterisierung der Zelllinien</i>	<i>25</i>
2.3.1. Bänderungs-Zytogenetik und Molekulare Zytogenetik zur Bestimmung des Karyotyps	25
2.3.2. Wachstum und Generationszeiten der verwendeten Zelllinien	25
2.4. <i>Herstellung der Stammlösungen der Testsubstanzen</i>	<i>25</i>
2.5. <i>Zytotoxizität der Cyclobutanonverbindungen</i>	<i>26</i>
2.6. <i>Genotoxizität der Cyclobutanonverbindungen</i>	<i>28</i>
2.6.1. Alkalischer Comet Assay zur Untersuchung der Genotoxizität in Kolonzellen unterschiedlicher Transformationsstadien	28
2.7. <i>Modulation des Glutathion Status und dessen Einfluss auf das Wirkpotenzial der 2-Alkylcyclobutanone ..</i>	<i>29</i>
2.7.1. Basale Glutathiongehalte der verwendeten Kolonzellsysteme	29
2.7.2. Hemmung der Glutathion-de-novo-Synthese in den Kolontumorzellen HT29clone19A	30
2.7.3. Induktion von 2ACB-induzierten DNA-Schäden mit dem Comet Assay in GSH-depletierten HT29clone19A Zellen	30
2.7.4. Modulation des Glutathionstatus durch 2-Dodecylcyclobutanon	30
2.8. <i>Nachweis klastogener Effekte von 2-Dodecylcyclobutanon in proliferierenden LT97 Adenomzellen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung</i>	<i>31</i>
2.8.1. Vorbereitung der LT97 Zellen auf den Mutagenitätstest nach OECD 473	31
2.8.2. 24-Farben-FISH zur Bestimmung struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen	32
2.8.3. 2-Farben-FISH zum Nachweis spezifischer Schäden im Tumorsuppressorgen TP53	32

2.9. Statistik.....	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Charakterisierung der Zelllinien.....	34
3.1.1. Ermittlung der Generationszeiten der Zelllinien.....	34
3.2. Akute Zytotoxizität der Cyclobutanonverbindungen in den.....	35
verschiedenen Kolonzelltypen.....	35
3.2.1. HT29clone19A Kolontumorzellen	36
3.2.2. LT97 Adenomzellen	38
3.2.3. Primäre Kolonzellen	41
3.3. Nachweis genotoxischer Effekte der Cyclobutanonverbindungen mit dem alkalischen Comet Assay	44
3.3.1. HT29clone19A Kolonkarzinomzellen	44
3.3.2. LT97 Adenomzellen	48
3.3.3. Primäre Kolonzellen	56
3.4. Einfluss des Glutathion-/Glutathion S-Transferase Enzymsystems auf die Genotoxizität der 2-Alkylcyclobutanone	64
3.4.1. Modulation des Glutathion-Status in human Kolonzellen durch 2-Alkylcyclobutanone	65
3.4.2. Hemmung der Glutathion-Neusynthese durch Buthioninsulfoximin – Auswirkungen auf die Genotoxizität von 2-Dodecylcyclobutanon in HT29clone19A Zellen	67
3.4.3. Induktion des Glutathion S-Transferase Systems in LT97 Zellen durch Butyrat	68
3.4.4. Modulation der 2-Alkylcyclobutanon-vermittelten Genotoxizität in LT97 Zellen nach Induktion des Glutathion S-Transferase Systems durch Butyrat	70
3.5. Untersuchung des klastogenen Potenzials von 2-Dodecylcyclobutanon mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung	71
3.5.1. Umsetzung der OECD Richtlinie 473 zur Untersuchung der Mutagenität des 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen	71
3.5.2. Induktion von Chromosomenaberrationen durch 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen (24-Farben-FISH-Analyse).....	74
3.5.3. Induktion spezifischer Schäden im Tumorsuppressorgen TP53 durch 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen (2-Farben-FISH-Analyse).....	82
4. Diskussion	85
4.1. Cyclobutanonverbindungen wirken in präneoplastischen und primären Kolonzellen nach akuter Exposition toxisch.....	86
4.2. Cyclobutanonverbindungen induzieren in präneoplastischen und primären Kolonzellen DNA-Schäden - Relevanz der Ergebnisse für die Kolonkarzinogenese.....	90
4.2.1. Cyclobutanonverbindungen sind nicht genotoxisch in differenzierten Kolontumorzellen	90
4.2.2. Cyclobutanonverbindungen induzieren zeit- und konzentrationsabhängig DNA-Schäden in Adenomzellen.....	91
4.2.3. Erhöhte Genotoxizität von 2-Dodecylcyclobutanon in primären Kolonozyten	92
4.3. Metabolismus der Cyclobutanonverbindungen – Bedeutung des Glutathion-/Glutathion S-Transferase-Systems	93
4.3.1. Einfluss des Glutathion-/Glutathion S-Transferase-Systems auf Cyclobutanon-induzierte DNA-Schäden.....	94
4.3.2. Modulation des Glutathion S-Transferase-Systems durch Butyrat - Auswirkungen auf Cyclobutanon-induzierte DNA-Schäden	95
4.4. Nachweis des klastogenen Potenzials von 2-Dodecylcyclobutanon in präneoplastischen Kolonzellen	97
4.5. 2-Dodecylcyclobutanon induziert Mutationen im TP53 präneoplastischer Kolonadenomzellen.....	99
4.5.1. Ethylmethansulphonat als Positivkontrolle	99
4.5.2. Einordnung der 2-Akylcyclobutanone als karzinogene Verbindungen	100
5. Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	102
6. Ausblick.....	107

7.Literatur	108
8.Anhang I.....	122
9.Anhang II	135
Ehrenwörtliche Erklärung	147

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die Lebensmittelbestrahlung und deren Zulassung in der Europäischen Union nach <i>DELINCÉE</i> 2002 [26].....	5
Tabelle 2:	Überblick über die verwendeten Zelllinien und deren Merkmale.....	23
Tabelle 3:	Bezeichnung der Kontrollen und ihre Abkürzungen	26
Tabelle 4:	Zytotoxizität (angeg. als Vitalität in % der Kontrolle) von 2dDCB in LT97 und primären Kolonzellen nach Normalisierung auf die Lösungsmittelkontrolle (Grundlage für Berechnung der EC ₅₀ Werte)	131
Tabelle 5:	Vitalitäten nach 30-minütiger Behandlung von HT29clone19A Zellen mit EtOH, 4-HNE und 2dDCB im Vorversuch	132
Tabelle 6:	Gegenüberstellung der auf EtOH normalisierten Ergebnisse zur Genotoxizität von 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton und der faktoriellen Veränderung in Abhängigkeit von der Zeit in frisch isolierten primären Kolonepithelzellen nach 30 und 60 min im Comet Assay.....	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entstehung von 2ACB aus Triglyceriden [23, 28].....	6
Abbildung 2:	Grundstruktur der häufigsten 2ACB in bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln [23, 28]	7
Abbildung 3:	Neutrale Bildung von γ -Lactonen aus Hydroxycarbonsäuren.....	10
Abbildung 4:	Schema der Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit direkter Fluoreszenzmarkierung der Sonden-DNA (A) und der indirekten Markierung über Haptene (B).....	19
Abbildung 5:	Multicolor-Labelschema für das Chromosom 17	19
Abbildung 6:	Aufarbeitung von humanem Dickdarmgewebe zu Einzelzellen nach Schäferhenrich et al. [107]	24
Abbildung 7:	Strukturformel von Buthionin-(S,R)-Sulfoximin.....	30
Abbildung 8:	Wachstumsverhalten der LT97 Zellen über 120 Stunden in MCDB Medium [n=3]	35
Abbildung 9:	Einfluss der Cyclobutanonverbindungen auf die Vitalität von HT29clone19A Zellen im Vergleich zur Vitalität nach der Gewinnung	37
Abbildung 10:	Einfluss der Cyclobutanonverbindungen auf die Vitalität von LT97 Zellen im Vergleich zur Vitalität nach der Gewinnung.....	40
Abbildung 11:	Einfluss der Cyclobutanonverbindungen auf die Vitalität von Primärzellen im Vergleich zur Vitalität nach der Aufarbeitung	43
Abbildung 12:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet.....	45
Abbildung 13:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet.....	46
Abbildung 14:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon.....	47
Abbildung 15:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet Assay mit 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton	48
Abbildung 16:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon [n=5]	49
Abbildung 17:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon [n=3]	50
Abbildung 18:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=6]	51
Abbildung 19:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=3]	52
Abbildung 20:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon [n=4].....	53
Abbildung 21:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon [n=3].....	54
Abbildung 22:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton [n=2]	55
Abbildung 23:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon [n=5]	57
Abbildung 24:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon (2% EtOH) [n=2].....	58
Abbildung 25:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=4]	59
Abbildung 26:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=2]	60

Abbildung 27:	Vitalität (A) und relative DNA-Schädigung (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon [n=2]	62
Abbildung 28:	Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton [n=3]	63
Abbildung 29:	Relative DNA-Schädigung durch 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton in primären Kolonzellen nach 30 und 60 min im Comet Assay [n=3]	64
Abbildung 30:	Basale Glutathiongehalte in den verwendeten Kolonzyellsystemen [n \geq 2]	65
Abbildung 31:	Glutathiongehalte nach Behandlung der Zellen mit 2dDCB für 30 und 60 min	66
Abbildung 32:	GSH-Gehalt der im Challenge Assay verwendeten HT29clone19A Zellen nach 18 Stunden Vorbehandlung mit 0,1 mM BSO [n=5]	67
Abbildung 33:	DNA-Schädigung in den Kontrollzellen (helle Säulen) im Vergleich zu GSH-depletierten HT29clone19A Zellen (dunkle Säulen) durch 2-Dodecylcyclobutanon.	68
Abbildung 34:	DNA-Schädigung in den Kontrollzellen (helle Säulen) im Vergleich zu GSH-depletierten HT29clone19A Zellen (dunkle Säulen) durch 2-Tetradecylcyclobutanon.	68
Abbildung 35:	GST-Gesamtaktivität in LT97 Adenomzellen nach Behandlung mit Butyrat für 24 h,	69
Abbildung 36:	A) Gesamtproteingehalt und B) GST-Aktivität pro mg Gesamtprotein in LT97 Adenomzellen nach Behandlung mit Butyrat für 24 h	69
Abbildung 37:	Induktion von DNA-Schäden im Comet Assay durch 2-Dodecylcyclobutanon nach Vorbehandlung der LT97 Adenomzellen mit Butyrat (1, 2 mM) für 24 Stunden [n=3]	70
Abbildung 38:	Prozentuale Anteile der abgelösten LT97 Zellen infolge der Inkubation mit 2dDCB nach 6, 12 und 24 Stunden [n=1]	72
Abbildung 39:	Vitalität der abgelösten (A) und der adhärenen (B) LT97 Adenomzellen nach Behandlung mit 2Dodecylcyclobutanon für 6, 12 und 24 Stunden [n=1]	73
Abbildung 40:	Induktion von DNA-Schäden in proliferierenden LT97 Adenomzellen nach 6 h 2dDCB [n=1; 1-50 μ M]	73
Abbildung 41:	Induktion von DNA-Schäden in proliferierenden LT97 Adenomzellen nach 6 h 2dDCB [n=1; 30-150 μ M]	74
Abbildung 42:	Mutationsspektrum von 1 mM EMS in LT97 Adenomzellen [n=2]	75
Abbildung 43:	Typisches Ergebnis der 24-Farben-FISH Analyse bei LT97 Adenomzellen nach 6 Stunden Inkubation mit den Testsubstanzen	77
Abbildung 44:	Induktion von aberranten Metaphasen (A) sowie Chromosomenbrüchen in 50 Zellen (B) bzw. in den aberranten Metaphasen (C) in LT97 Adenomzellen nach 6-stündiger Behandlung mit EMS (1mM), 4-HNE (150 μ M) und 2-Dodecylcyclobutanon	78
Abbildung 45:	Mutationsspektrum von 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen: (A) Anteil der einzelnen Aberrationen an der Gesamtbruchzahl in % und (B) in Chromosomenbrüchen	79
Abbildung 46:	Anzahl der Brüche in den tumorrelevanten Chromosomen 5, 12, 17 und 18 im Vergleich zur Gesamtbruchzahl je 50 Metaphasen	80
Abbildung 47:	Prozentualer Anteil aller Chromosomenschäden (50 Metaphasen) im Chromosom 17 der Adenomzelllinie LT97 nach 1mM EMS, 150 μ M HNE, 0,3 % EtOH und 2-Dodecylcyclobutanon (30-150 μ M)	81
Abbildung 48:	Entstehung zusätzlicher Markerchromosomen in Abhängigkeit von der Behandlung der LT97 Adenomzellen mit den Testsubstanzen in μ M	82
Abbildung 49:	Metaphasenaufnahmen: Gesamt-DNA (DAPI), 17p-Arm (FITC),	83
Abbildung 50:	Metaphasenaufnahmen: Gesamt-DNA (DAPI), 17p-Arm (FITC),	83
Abbildung 51:	Mutationsspektrum des <i>TP53</i> in der Tochtergeneration der mit den Testsubstanzen behandelten LT97 Adenomzellen	84
Abbildung 52:	Übersicht über das Verhalten der Kontrollzellen (HT29clone19A), welche zusätzlich zu den 2ACBs zeitgleich mit RPMI 1640-Medium (unbehandelte Kontrolle, UK) und 150 μ M 4-HNE (Positivkontrolle, PK II) inkubiert wurden.	128
Abbildung 53:	Übersicht über das Verhalten der Kontrollzellen (LT97), welche zusätzlich zu den 2ACBs zeitgleich mit RPMI 1640-Medium (unbehandelte Kontrolle, UK) sowie 100 und 150 μ M 4-HNE (Positivkontrolle, PK I + II) inkubiert wurden.	129
Abbildung 54:	Übersicht über das Verhalten der Kontrollzellen (Primärzellen), welche zusätzlich zu den 2ACBs zeitgleich mit RPMI 1640-Medium (unbehandelte Kontrolle, UK) sowie 100 und 150 μ M 4-HNE (Positivkontrolle, PK I + II) inkubiert wurden.	130
Abbildung 55:	Vergleich der DNA-Strangbruchinduktion in HT29clone19A Zellen durch EtOH allein, durch 250 μ M 4-HNE sowie durch 2dDCB mit unterschiedlichen EtOH-Anteilen nach 30 min im Comet Assay	132
Abbildung 56:	Induktion von DNA-Schäden im Comet Assay durch 4-HNE nach Vorbehandlung der LT97 Zellen mit Butyrat (1, 2 mM) für 24 Stunden [n=2]	134
Abbildung 57:	Genotoxizität von 2-Tetradecenylcyclobutanon (links) und der Kontrollen (rechts) in	134

Abbildung 58:	Gegenüberstellung der relativen DNA-Schädigung aller 2ACB und des Laktons in LT97 Zellen (links) und primären Kolonzellen (rechts).....	134
---------------	---	-----

Abkürzungsverzeichnis

2ACB	2-Alkylcyclobutanone	kGy	kilo Gray
2dDCB	2-Dodecylcyclobutanon	LOH	Loss of Hetrocygocity
2tDCB	2-Tetradecylcyclobutanon	LMA	Low Melting Agarose
2tDeCB	2-Tetradecenylcyclobutanon	LM	Lebensmittel
4tDBL	4-Tetradecyl-γ-Butyrolakton	M	molar (mol/l)
4-HNE	4-Hydroxy-2-nonenal	MeV	Megaelektronenvolt
bp	Basenpaar(e)	mg	Milligramm
BSA	Bovines Serum Albumin	min	Minute
Caco-2	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie	ml	Milliliter
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol	MS	Massenspektrometrie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle-Medium	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	Dimethylsulfoxid	n	Anzahl der Versuchsansätze
EC₅₀	Halbmaximale Wirkstoffkonzentration	NASA	National Aeronautics and Space Administration
EG	Europäische Gemeinschaft	NFκB	Nuklearer Faktor kappa B
eV	Elektronenvolt	ng	Nanogramm
FAO	Organisation für Ernährung und Landwirtschaft der Vereinten Nationen	NMA	Normal Melting Agarose
FCS	Fetal Calf Serum	OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit u. Entwicklung
FDA	United States Food and Drug Administration	OT	Objektträger
fg	Femtogramm	p53	Tumorsuppressorprotein
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung	PAK	Polychlorierte Aromatische Kohlenwasserstoffe
FSU	Friedrich-Schiller-Universität	PBS	Phosphate Buffered Saline
g	Gramm	PS	Palmitinsäure
GC	Gaschromatographie	ROS	Reactive Oxygen Species
GSH	Glutathion	RT	Raumtemperatur
GST	Glutathion S-Tanferase	SCF	Scientific Committee on Food
Gy	Gray, Strahlendosis:	TI	Tail Intensity
h	Stunde	TP53	Tumorprotein 53
HAA	Heterozyklische Aromatische Amine	TRP Assay	tryptophan reverse mutation assay
IAEA	Internationale Atomenergiebehörde	USA	United States of America
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature	WHO	Weltgesundheitsorganisation
KG	Körpergewicht	ZZ	Zellzahl
kg	Kilogramm		

1. EINLEITUNG

Die Gesundheit ist eng mit der Ernährung verbunden. Die Ernährungswissenschaft im Allgemeinen und die Ernährungstoxikologie im Besonderen erforschen jedoch nicht nur der Gesundheit zuträgliche Nahrungsmittel oder speziell deren Inhaltsstoffe, sondern auch Nahrungsmittelkontaminanten mit einem möglichen gesundheitsgefährdenden Potenzial. Dabei stehen das Erkennen dieser Kontaminanten und die Charakterisierung ihrer molekularen toxikologischen Eigenschaften im Vordergrund.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die molekulartoxikologische Charakterisierung von einer Gruppe organischer Verbindungen, den „Unique Radiolytic Products“ (URP), welche bisher ausschließlich in bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln gefunden wurden. Es handelt sich um zyklische Derivate von häufig in Lebensmitteln vorkommenden Fettsäuren, die durch den Einsatz von ionisierenden Strahlen entstehen [1]. Die nach der Lebensmittelbestrahlungsverordnung vom 14.12.2000 in Deutschland verbotene Lebensmittelbestrahlung, mit Ausnahme von Kräutern und Gewürzen, ist eine Methode zur Haltbarmachung von überwiegend tierischen Lebensmitteln (Fleisch, Eier, Krustentiere) sowie von Obst und Gemüse. Die Bestrahlung mit γ - oder Elektronenstrahlen stellt eine kostengünstigere und vor allem schnelle Alternative zu den herkömmlichen Konservierungsverfahren dar. Als sowohl von der United States Food and Drug Administration (FDA) als auch von der World Health Organisation (WHO) und des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) bestätigte sichere Alternative gewinnt die Bestrahlung besonders in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) an Bedeutung, wo es ohne den Einsatz der Strahlenkonservierung zu mehr als 76 Millionen Infektionen und circa 5000 Todesfällen pro Jahr durch Lebensmittelpathogene kommen würde [2].

1.1. Bestrahlung in der Lebensmittelindustrie - Bedeutung für den Endverbraucher

1.1.1. Verarbeitung von Lebensmitteln

Das Ziel der Lebensmittelverarbeitung ist nicht nur die Verbesserung des Geschmacks, sondern in vielen Fällen auch zuerst die Erhöhung der Bekömmlichkeit und in diesem Zusammenhang die bessere Bioverfügbarkeit einiger Inhaltsstoffe des Lebensmittels sowie die Abtötung von Krankheitserregern. Hierbei ist die thermische Behandlung eine der wichtigsten Voraussetzungen dafür, die Nahrung essbar zu machen und darüber hinaus die erforderliche Qualität, Funktionalität und Sicherheit zu gewährleisten. Auch die Lagerfähigkeit lässt sich

durch eine thermische Behandlung erhöhen. Durch Prozesse wie Backen, Braten, Frittieren, Grillen, Konservieren sowie durch die Einwirkung von Mikrowellen oder auch durch Gefriertrocknung kommt es in Nahrungsmitteln zu einer Veränderung einzelner Makro- und/oder Mikronährstoffe [3]. Diese Veränderungen können erwünscht sein und tragen so zum Beispiel zum Aroma und zum Aussehen (Maillard Produkte) des Lebensmittels bei. Nährstoffverluste oder die Entstehung von Lebensmittelkontaminanten infolge des Verarbeitungsprozesses sind dagegen nicht erwünscht. Eine wissenschaftliche Bearbeitung mikrobiologischer, hygienischer und toxikologischer Fragestellungen dient somit der Gewährleistung qualitativer Eigenschaften tierischer und pflanzlicher Lebensmittel sowie der Produktsicherheit. Dabei befasst sich die Toxikologie mit der Identifizierung verschiedener Klassen dieser unerwünschten Kontaminanten und deren Charakterisierung hinsichtlich ihrer gesundheitlichen Relevanz. Beispiele für Kontaminanten infolge einer thermischen Behandlung sind Heterozyklische Aromatische Amine (HAA), Nitrosamine, Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sowie Acrylamid [4]. Aldehyde und biogene Amine sind ebenfalls Nebenprodukte einer thermischen Behandlung von Lebensmitteln. Fast immer spielt dabei die Anwesenheit von Eiweißen eine Rolle. Dies gilt nicht für 2-Alkylcyclobutanone (2ACB), welche durch keine der bisher bekannten Haltbarmachungsverfahren entstehen [5].

1.1.2. Lebensmittelbestrahlung

Nicht nur in den USA sind wichtige Quellen für Lebensmittelpathogene eine unsaubere Produktion und der unsachgemäße Umgang beim Kochen und Lagern von Fleisch und Geflügelprodukten [6-7]. Nationale und internationale medizinische, wissenschaftliche und öffentliche Gesundheitsorganisationen sowie Gruppen aus dem Bereich der Lebensmittelverarbeitung sehen in der Bestrahlung von Lebensmitteln ein großes Potenzial zur Senkung der Inzidenz lebensmittelabhängiger Erkrankungen [3]. Doch die Anwendung dieser Technologie beschränkte sich im Jahr 2004 auf 10% der Kräuter und Gewürze und auf weniger als 0,002% des Obst und Gemüses, Fleisches und Geflügels des US-amerikanischen Marktes [8]. Die Ursache hierfür liegt zum einen in der geringen Akzeptanz der Bestrahlung durch den Verbraucher, welcher bereits durch die Terminologie „Bestrahlung“ verunsichert wird und sie mit Radioaktivität gleichsetzt. Zum anderen werden die Präventionsstrategien zur Vermeidung lebensmittelassoziierter Erkrankungen kaum von der Öffentlichkeit verstanden. Zum Dritten verfügen sowohl Gesundheitsprofis als auch die Medien nur über laienhafte Kenntnisse, wenn es um den Nutzen der Lebensmittelbestrahlung geht [3].

1.1.3. Entwicklung und Anwendung der Technologie

Die Anfänge der Bestrahlung liegen im Jahre 1895, als Henry Becquerel zeigen konnte, dass in Lebensmitteln, nahe Radium platziert, die Bakterien durch die γ -Strahlen abgetötet wurden [9-10]. Bei dieser wissenschaftlichen Erkenntnis blieb es zunächst, da Radium zu dieser Zeit zu teuer war, um es für Konservierungszwecke zu nutzen. Erst 1905 beschrieb ein englisches Patent den Gebrauch von Bestrahlung zur Abtötung von Bakterien in Lebensmitteln [11]. 1921 wurden dann Röntgenstrahlen eingesetzt, um *Trichinella spiralis* in Schweinefleisch abzutöten. Erst nach dem Zweiten Weltkrieg wurde der Einsatz der Bestrahlung als Entwicklungszweig der Kernenergie in den USA aktiv gefördert. Tatsächlich wurde sie vor allem zur Sterilisierung medizinischer Geräte und Verbrauchsmaterialien eingesetzt, doch die kommerzielle Herstellung bestrahlter Produkte begann in den USA erst 1992 [12]. In Kanada dagegen wurden bereits 1960 Kartoffeln als erstes bestrahltes Produkt zugelassen. 1972 schickte die NASA strahlenkonserviertes Fleisch als keimfreie Nahrung mit einer Haltbarkeit von zwei bis drei Jahren zusammen mit den Apollo 17 Astronauten zum Mond. 1985 wurde in den USA die Bestrahlung zum Zweck der Konservierung von Schweinefleisch erlaubt [13]. Nach Zulassung der Strahlenbehandlung von Geflügelfleisch 1990 darf seit Dezember 1997 auch rotes Fleisch, also Rindfleisch, mittels Bestrahlung sterilisiert werden [14-15]. Die Methode ist sehr effektiv, um Trichinen (Schweinefleisch), Salmonellen (Geflügel) oder *E. coli* (Hackfleisch) abzutöten [16].

Die Lebensmittelbestrahlung ist eine hoch effektive Technologie zur Reduktion der mikrobiellen Belastung. Durch kontrollierte Bestrahlung von Lebensmitteln werden pathogene Keime und unerwünschte Mikroorganismen, Parasiten oder Insekten abgetötet, wodurch sich die Haltbarkeit der Lebensmittel erhöht. Im Prozess der Bestrahlung, zum Beispiel durch einen Elektronenbeschleuniger (Röntgen- und Elektronenstrahlen), radioaktive Isotope wie Kobalt-60 (γ -Strahlen) oder Hochspannung, dringen die hoch-energetischen Partikel in das Produkt ein. In Lebensmitteln, die zu einem großen Anteil aus Wasser bestehen (10-90% Wasseranteil), kommt der Radiolyse von Wasser eine besondere Bedeutung zu. Die primär gebildeten Wasserradikale (OH^\cdot , H^\cdot) reagieren nicht nur untereinander, sondern auch mit den zellulären Makromolekülen wie Proteinen und hauptsächlich der DNA. Deren Schädigung zerstört lebende Zellen. Auf diese Weise können alle Prozesse, die mit der Keimung und der Reifung in Zusammenhang stehen, unterbrochen werden, Pathogene und Insekten sterben ab [17-18].

Charakteristisch für eine Strahlung ist ihre Energie, welche in Elektronenvolt (eV) gemessen wird. Die Energie der γ -strahlung von Kobalt-60 beträgt beispielsweise 1,3 MeV. Für die Lebensmittelbestrahlung werden aus Sicherheitsgründen nur Röntgenstrahlen von <5 MeV und Elektronenstrahlen <10 MeV eingesetzt. Die Energiedosis einer Strahlung beschreibt die SI-Einheit Gray (Gy). 1 Gy entspricht dem von 1 kg Materie aufgenommenen Energiebetrag von 1 Joule [19].

Die Strahlendosen werden in 3 Anwendungskategorien eingeteilt. Zur Desinfektion und Verlängerung der Haltbarkeit werden sehr geringe Dosen bis 1 kGy eingesetzt. 1-10 kGy gelten als Pasteurisierungsdosis für Fleisch, Geflügel und andere Lebensmittel. Sehr hohe Dosen bis 10 kGy sterilisieren oder reduzieren zumindest die Anzahl von Mikroorganismen in Gewürzen [20]. Im Allgemeinen betragen die Strahlendosen weniger als 10 kGy. Das bedeutet, dass gerade so viel Energie eingesetzt wird wie notwendig ist, um die meisten Mikroorganismen abzutöten und so ein nahezu steriles Produkt zu erhalten. Nach Angaben von Health Canada, der kanadischen Bundesanstalt für Verbrauchergesundheit werden hierüber 99,99 % der potenziell gesundheitsgefährdenden Bakterien wie *Escherichia coli* O157 und *Salmonella spp.* in Fleisch abgetötet [9]. Aber auch *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Yersinia enterocolitica* werden durch die Strahlenpasteurisation inaktiviert. Dies führt zu einer signifikanten Abnahme der Inzidenz an Infektionen und Todesfällen durch den Konsum von pathogen-kontaminierten Lebensmitteln [21]. Beispielsweise verlängert sich die Haltbarkeit von bestrahltem Hühnerfleisch um das Zwei- bis Dreifache (auf 14 bis 22 Tage) im Vergleich zu nicht bestrahlten Produkten.

Bis heute wurde der Vertrieb von bestrahlten Lebensmitteln in mehr als 60 Ländern erlaubt und inzwischen wird sie in verschiedenen Ländern an einer großen Palette von Lebensmitteln angewandt, die entweder direkt zum Verbraucher gelangen oder in der Lebensmittelindustrie weiterverarbeitet werden [22-23]. Besonders bei Lebensmittelzutaten für die industrielle Weiterverarbeitung wird die Bestrahlung als eine aussichtsreiche Alternative zu anderen Konservierungsverfahren angesehen. So können Kräuter und Gewürze erfolgreich durch Bestrahlung entkeimt werden, statt sie einer Begasung mit Ethylenoxid zu unterwerfen, was mit potenziell schädlichen Rückständen verbunden sein kann [24]. Der Gebrauch von strahlenpasteurisierten Lebensmitteln nimmt nur sehr langsam zu, wobei er primär in Krankenhäusern und Langzeitbetreuungseinrichtungen von Bedeutung ist, um das Risiko für Kreuzkontaminationen bei der Speisenzubereitung zu reduzieren und eine mikrobiologisch sichere Versorgung von immunschwachen Patienten zu gewährleisten [25].

Die Tab. 1 zeigt, in welchen anderen Ländern der Europäischen Union die Bestrahlung zur Haltbarmachung eingesetzt wird und welche Lebensmittel bestrahlt werden dürfen.

Tabelle 1: Übersicht über die Lebensmittelbestrahlung und deren Zulassung in der Europäischen Union nach *DELINCÉE* 2002 [26]

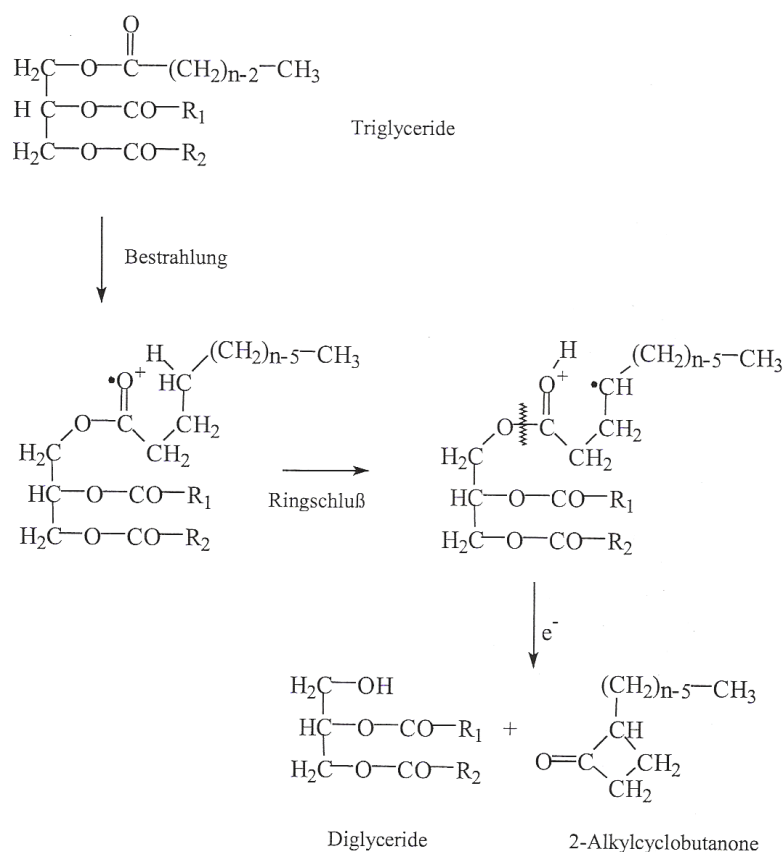
Lebensmittelbestrahlung	
Zulassung in Staaten der Europäischen Union (Stand 20.07.2002)	
Nach EU-Richtlinie 1999 / 2 / EG (wirksam ab 20.09.2000) in allen EU-Ländern zugelassen für Kräuter und Gewürze. Nach Deutschem Recht umgesetzt in der „Lebensmittelbestrahlungsverordnung“ vom 14.12.2000 (in Kraft seit 21.12.2000)	
Die EU-Richtlinie 1999 / 2 / EG (wirksam ab 20.09.2000) untersagt das Inverkehrbringen von nicht mit dieser Richtlinie übereinstimmenden Erzeugnissen (ab 20.03.2001), ermöglicht jedoch – bis zur Einigung auf die entgeltliche EU-Positivliste – in den einzelnen Ländern in Übereinstimmung mit der jeweiligen national geltenden Gesetzgebung die Bestrahlung von nachfolgend aufgeführten Lebensmitteln:	
Belgien	Kartoffeln; Zwiebeln, Knoblauch, Schalotten; Froschschenkel, tiefgefroren; geschälte Garnelen, tiefgefroren; Eiklar; mechanisch entbeintes Geflügelfleisch
Frankreich	Getreideflocken; Reismehl; Gummi arabicum; Gewürzkräuter, tiefgefroren; Zwiebeln, Knoblauch, Schalotten; Trockenfrüchte und –Gemüse; Caseinate; Eiklar; Froschschenkel, tiefgefroren; geschälte Garnelen, tiefgefroren; Geflügel, -innereien, entbeintes Geflügelfleisch
Großbritannien	Getreide; Zwiebeln, Knoblauch, Schalotten; Gemüse, Hülsenfrüchte; Obst, Pilze; Geflügel; Kartoffeln; Fische, Krebs, Weichtiere, Muscheln
Italien	Kartoffeln; Zwiebeln, Knoblauch
Niederlande	Getreideflocken; Gummi arabicum; Hülsenfrüchte; Trockenfrüchte und –Gemüse; Eiklar; Froschschenkel, tiefgefroren; Garnelen; Hühnerfleisch

Durch die EG wurde eine Rahmenrichtlinie zur Lebensmittelbestrahlung erlassen, welche am 20. März 1999 in Kraft getreten ist [27]. Die Umsetzung in deutsches Recht erfolgte mit der Neufassung der Lebensmittelbestrahlungsverordnung (LMBestV, gültig seit dem 21. Dezember 2000). Nach dieser LMBestV vom 14. Dezember 2000 (BGBl. I S. 1730), zuletzt geändert durch Artikel 359 der Verordnung vom 31. Oktober 2006 (BGBl. I S. 2407) ist die Behandlung von getrockneten aromatischen Kräutern und Gewürzen mit Elektronen-, Gamma- und Röntgenstrahlen (Bestrahlung) zugelassen. Damit ist das in Deutschland bisher gültige allgemeine Bestrahlungsverbot (§ 13 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997 (BGBl. I S. 2296), zuletzt geändert durch Gesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045)) außer Kraft gesetzt.

1.2. Veränderung von Lebensmittelinhaltsstoffen durch ionisierende Strahlen

Die Bestrahlung von Lebensmitteln verändert die wesentlichen und typischen Eigenschaften eines Lebensmittels nicht. Jedoch findet in geringem Umfang, aber messbar, ein Abbau von praktisch allen Inhaltsstoffen statt: Vitamine, Fettsäuren, Kohlenhydrate, Proteine. Lediglich Mineralstoffe bleiben völlig unbeeinflusst [16].

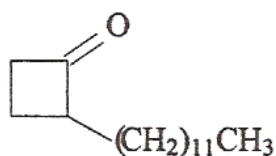
Abbildung 1: Entstehung von 2ACB aus Triglyceriden [23, 28]



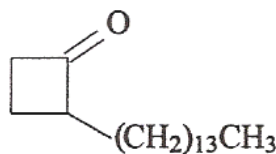
Neben diesen marginalen Veränderungen kommt es zusätzlich zur Bildung von relativ stabilen radiolytischen Verbindungen unter anderem durch freie Radikale und Peroxylradikale, welche nachweislich schon bei geringen Bestrahlungsdosen von weniger als 1 kGy entstehen [29]. In diesem Dosisbereich entstehen auch Acetaldehyd, Benzen, Toluol und Formaldehyd, welche auch in den meisten anderen Verarbeitungsprozessen, wie z. B. Kochen, entstehen [22]. Darüber hinaus wurde vor ca. 37 Jahren eine neue Klasse von Lebensmittelkontaminanten entdeckt, welche bisher ausschließlich nach Bestrahlung von fetthaltigen Lebensmitteln nachweisbar waren [1, 30-31]. Bei diesen als URP bezeichneten Verbindungen handelt es sich um 2-Alkylcyclobutanone (2ACB).

1.2.1. 2-Alkylcyclobutanone: Entstehung und Vorkommen

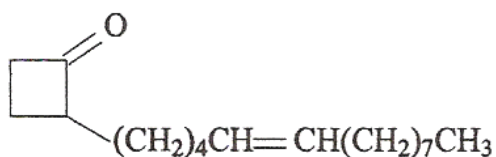
Bereits 1972 gelangten *LETILLIER* und *NAVAR* zu der Erkenntnis, dass synthetische Triglyceride mit einer Kohlenstoffatomanzahl von C6 bis C18 durch ionisierende Strahlen ihre molekulare Struktur verändern [1, 28]. Die Abb. 1 zeigt die Entstehung der 2ACB als zyklische Verbindungen aus den Vorläuferfettsäuren [23]. Demnach entstehen 2ACB durch den Verlust eines Elektrons vom Sauerstoff der Carbonylgruppe einer Fettsäure (FS) oder Triglycerids und einem darauf folgenden Umordnungsprozess. 2ACB weisen dieselbe Anzahl an Kohlenstoffatomen wie ihre Vorläuferfettsäuren auf, wobei an der Ringposition 2 eine Alkylgruppe mit $n-4$ Kohlenstoffatomen substituiert wurde. Aus den häufig in Lebensmitteln zu findenden Fettsäuren Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure gehen die Cyclobutanone 2-



2-Dodecylcyclobutanon



2-Tetradecylcyclobutanon



2-Tetradec-5'-enylcyclobutanon

Dodecyl-, 2-Tetradecyl-, 2-Tetradec-5'-enyl-, und 2-Tetradeca-5',8'-dienylcyclobutanon hervor (Abb. 2) [28]. 1990 erarbeiteten *STEVENSON ET AL.* als erste eine Methode zum Nachweis dieser Verbindungen in Lebensmitteln nach Bestrahlung [30]. Durch den Verzehr von bestrahlten Lebensmitteln bzw. Lebensmittelzutaten ist der Verbraucher der Wirkung der 2ACB ausgesetzt [23]. Diese Erkenntnis und die Tatsache, dass 2ACB bisher weder in unbestrahlten noch in herkömmlich konservierten Lebensmitteln nachweisbar sind, führten zu der Frage einer toxikologischen Relevanz dieser Kontaminanten [5].

Abbildung 2: Grundstruktur der häufigsten 2ACB in bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln [23, 28]

1.2.2. Toxikologie der 2-Alkylcyclobutanone

Basierend auf der jahrzehntelangen, intensiven Forschung in den USA schlussfolgerte 1981 ein Expertenkomitee der FAO/IAEA/WHO (WHO-Bericht N°659), dass eine Bestrahlung von Lebensmitteln bis zu einer mittleren Gesamtdosis von 10 kGy gesundheitlich unbedenklich ist [32]. Die positive Beurteilung dieses Verfahrens durch die WHO und durch andere Gremien erklärt dessen zunehmende Bedeutung. Darüber hinaus wurden zahlreiche geeignete und zuverlässige Techniken zur Untersuchung der Bestrahlung von Lebensmittel entwickelt, mit dem Ziel die Verbraucher besser informieren und den Missbrauch der Technik

ausschließen zu können. Jedoch geben die Ergebnisse der wenigen Forschergruppen in Deutschland, Frankreich und den USA, welche sich vor allem mit toxikogenetischen Wirkmechanismen der 2ACB sowohl im Tiermodell als auch in humanen Zellmodellen beschäftigen, Anlass zur Diskussion und einer Neueinschätzung der gesundheitlichen Risiken durch diese Lebensmittelkontaminanten.

Die ersten diesbezüglich von *DELINCÉE UND POOL-ZOBEL* durchgeführten *in vitro* Untersuchungen mit 2-Dodecylcyclobutanon (2dDCB, 1 mg/ml) an Dickdarmzellen der Ratte und des Menschen wiesen auf ein genotoxisches Potenzial dieses Palmitinsäurederivates hin [33]. Folgende *in vivo* Studien untersuchten DNA-Schäden in Kolonzellen von Ratten. Diese erhielten über eine Schlundsonde verschiedene Dosierungen an 2dDCB (1,12-14,9 mg/kg KG). Nach 16-stündiger Einwirkzeit wurden die Kolonzellen isoliert und in den Comet Assay eingebracht [34]. In beiden Versuchsansätzen wurden unabhängig voneinander geringe, aber signifikante DNA-Strangbrüche nachgewiesen. Eine weitere Studie im Rahmen eines grenzüberschreitenden Forschungsvorhabens der Universitäten Karlsruhe und Strasbourg (INTERREG II) hatte zum Ziel, das toxikologische Potenzial zu charakterisieren und eine Risikoabschätzung für den Verbraucher durch den Verzehr bestrahlter Lebensmittel vorzunehmen. Nach erfolgreicher Herstellung hoch reiner 2ACB und verschiedener Derivate durch verbesserte Synthesemethoden wurden diese, zur Bestimmung der Exposition der Verbraucher gegenüber 2ACB, als Standards für die GC und MS Analyse der verschiedenen Cyclobutanone in Lebensmitteln sowie für die Durchführung toxikologischer Tests verwendet [23, 35]. Die Autoren fanden in guter Übereinstimmung mit früher gefundenen Mengen für Hähnchenfleisch immer Werte zwischen 0,3 und 0,6 µg/g Fett/kGy für die Bildung von 2dDCB [5, 31, 36-40]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Ausgangsfettsäure durch Bestrahlung immer etwa 1,6 nmol 2ACB/mmol Vorläuferfettsäure/kGy entstehen, wodurch eine Vorhersage der Mengen an 2ACB durch Bestrahlung möglich wurde.

In Lebensmitteln findet man hauptsächlich Palmitin-, Stearin- und Ölsäure (und etwas weniger Palmitoleinsäure) [28]. Durch Bestrahlung werden daher vor allem 2dDCB, 2tDCB, 2tDeCB (und 2dDeCB) gebildet, so dass diese 2ACB auch die wichtigsten Substanzen für eine toxikologische Betrachtung von bestrahlten Lebensmitteln darstellen. Anhand der Ergebnisse und ausgehend von 0,3 µg 2dDCB/g Hähnchenfett/kGy unter Beachtung des Fettgehaltes von Hühnchenfleisch (10%), einem Zubereitungsverlust von 20% und des Anteils von Palmitinsäure am gesamten FS-Spektrum von 20% errechneten die Autoren einen Gehalt von 0,4 µg 2ACB in 1 g zubereitetem Hähnchenfleisch, welches mit 3 kGy (obere Dosis für die

Strahlenpasteurisierung von Hähnchen in den USA) bestrahlt wurde und schlussfolgerten, dass der Verbraucher beim Verzehr von 200 g bestrahltem Hähnchen ca. 80 µg 2ACB aufnimmt [23]. Dies würde bei einem Durchschnittskörpergewicht von 70 kg zu einer physiologischen Exposition von etwa 1 µg 2-ACB/kg Körpergewicht führen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde der Vergleich mit einer der bisher größten durchgeführten Tierfütterungsstudien (Raltech-Studie) möglich. Dabei zeigte sich, dass die vergleichsweise hohen Gehalte an 2ACB im Futter (<1,5 µg 2-ACB/g Diät; 250 µg/kg KG, Maus) [40], welche unter Anwendung von hohen Strahlendosen erzeugt wurden, keine negativen Effekte (einschließlich Mutagenität und Kanzerogenität) zur Folge hatten [41].

In der INTERREG II Studie ging es vorrangig darum, ähnliche Fragestellungen wie in den vorangegangenen Studien zu bearbeiten. Der Fokus lag hierbei jedoch auf der Verwendung von hoch reinen (>97%), synthetisch hergestellten 2ACB, denn die Identität und die Reinheit der in früheren Studien verwendeten Testsubstanzen wurden nicht verifiziert und eine spätere Charakterisierung über GC-MS Spektren, etc. war leider nicht mehr möglich [33-34, 42]. Neben *in vitro* Untersuchungen mit bedeutend geringeren 2ACB-Konzentrationen an humanen Dickdarmepithelzellen als Zielzellen und an *Salmonella typhimurium* Stämmen wurden auch Fütterungsstudien mit höheren Dosen der 2ACB an Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse von RAUL ET AL. in diesem Projekt zeigten, dass 2tDCB und 2tDeCB einen Tumorpromotor-Effekt im Prozess der Kolonkarzinogenese haben, was ein deutlicher Hinweis auf das genotoxische Potenzial ist [43]. Darüber hinaus wurden neue Kenntnisse in Bezug auf die Verteilung, Akkumulation und Ausscheidung der 2ACB nach Aufnahme in den Organismus der Ratte gewonnen. Es wurde geschlussfolgert, dass die Verbindungen die intestinale Barriere passieren können, jedoch nicht unverändert gespeichert bzw. ausgeschieden werden, sondern möglicherweise im Organismus akkumulieren oder in großem Umfang einer Verstoffwechselung unterliegen. Basierend auf diesen Untersuchungsergebnissen postulierten die Autoren, dass in Abhängigkeit der Länge der aliphatischen Seitenkette besonders die Derivate der kurzkettigen Fettsäuren Myristin- und Palmitinsäure (2DCB, 2dDCB) eine ausgeprägte Reaktivität gegenüber bakteriellen Zellsystemen (*Salmonella typhimurium* Stämme TA97, TA98 und TA100) haben, wobei die molekulare Basis für diese Toxizität gegenwärtig noch unklar ist [23]. In den humanen Kolonzellsystemen traten signifikante Effekte wie der Rückgang der metabolischen Aktivität der Zellen (MTT-, WST-1-Test) oder die Zunahme von Membranschäden durch 2tDCB (≥ 50 µM) nach Expositionszeiten von 24 und 48 Stunden auf [42]. Im Gegensatz hierzu zeigte jedoch die Studie von GADGIL UND SMITH mit 2dDCB, Cyclohexanon und 2-Nonenal im

Mikrotox Assay, dass das von 2dDCB ausgehende Risiko als sehr gering einzustufen ist [44]. Untersuchungen zur Genotoxizität der 2ACB mittels Comet Assay zeigten im Vergleich zu den ersten Studien an Ratten- und humanen Dickdarmzellen kontroverse Ergebnisse [23, 33]. In der INTERREG II Studie konnten genotoxische Effekte nicht zytotoxischer Konzentrationen ($<50 \mu\text{M}$) nur durch die Bildung von Fpg-sensitiven DNA-Läsionen als Folge oxidativer DNA-Schäden in HeLa Zellen beobachtet werden [23]. Weitere validierte Genotoxizitätstests folgten, wobei von keiner der aktiven Forschergruppen eine mutagene Aktivität der 2ACB in bakteriellen Testsystemen nachgewiesen werden konnte. Konzentrationen von weniger als 1,0 mg 2dDCB/Ansatz induzieren nach *SOMMERS* keine Mutationen im *Escherichia coli* TRP Assay (tryptophan reverse mutation) und in keinem der getesteten *Salmonella typhimurium* Stämme (TA98, TA100, TA1535, und TA1537), was von *GADGIL ET AL.* unabhängig bestätigt werden konnte [44-46]. Weiterhin können auch Effekte hinsichtlich intrachromosomaler Rekombination, getestet am *Saccharomyces cerevisiae* Stamm RS112, ausgeschlossen werden [46]. Die genannten Arbeiten bilden die Basis für die vom Scientific Committee on Food (SCF) im Jahre 2003 geforderten Untersuchungen bezüglich der Induktion von Gen- und/oder Chromosomenmutationen, welchen auch in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden soll [47].

1.2.3. Metabolisierung der Cyclobutanonverbindungen - Stand der Wissenschaft

Bereits kurz nach der Entdeckung der zyklischen Derivatisierung von Fettsäuren nach Bestrahlung wurden erste Überlegungen zur Metabolisierung dieser Verbindungen angestellt. Es ist bekannt, dass die Oxidation von 2ACB zur Bildung von Laktone führt. Bereits 1979 beobachteten *VAJDI ET AL.* die Bildung von langkettigen γ - und δ -Laktone nach Bestrahlung von Fleisch mit sehr hohen Dosen [48]. Es wurde vermutet, dass der Umwandlung aus Fettsäuren oder Triglyceriden zum Laktone oxidative Prozesse zugrunde liegen. Ein Beispiel aus der vorliegenden Arbeit ist das 4-tetradecyl- γ -Butyrolaktone, welches durch Oxidation von 2tDCB entsteht [23]. Es ist denkbar, dass *in vivo* ein ähnlicher Mechanismus für den Abbau der 2ACB verantwortlich sein kann. Vergleichsweise resultiert die neutrale Bildung von γ -Laktone aus Hydroxycarbonsäuren (Abb. 3) in einer beständigen Form eines inneren Esters dieser organischen Säuren.



Abbildung 3: Neutrale Bildung von γ -Laktone aus Hydroxycarbonsäuren

Eine direkte Umformung von 2dDCB zu 5-dodecyl-oxolan-2-on (γ -Palmitolakton) wurde nach Injektion in den Hasenorganismus von *ELLIOT ET AL.* 1995 beobachtet als ein Antikörper gegen 11-(2'-oxocyclobutyl)undecanoic acid, ein 2-substituiertes Cyclobutanon mit einer terminalen Carboxylgruppe, hergestellt werden sollte, um einen ELISA zur Detektion der 2ACB zu entwickeln [49]. Der Antikörper zeigte eine signifikante Kreuzreaktivität nicht nur mit 2dDCB, sondern auch mit seinem korrespondierenden Lakton. *ELLIOT ET AL.* schlussfolgerten, dass während oder nach der Konjugation oder Impfung ein signifikanter Teil des 2dDCB zum Lakton umgewandelt wurde. Aber auch 2dDCB, welches für mehrere Monate bei 4°C in Hexan-Lösung aufbewahrt wurde, unterlag einer Umwandlung zu γ -Palmitolakton [50]. Die Ringstruktur eines Laktons ähnelt dem des Furans, einem aromatischen Fünfring mit Sauerstoff als Heteroatom [51].

Erste Ansätze postulierten eine Metabolisierung der 2ACB zu Kohlendioxid (CO₂) als Hauptabbauprodukt. Dabei würde die Alkylseitenkette abgespalten der und zur Oxidation des Laktonringes, ähnlich dem in Ratten gefundenen Furanabbauweg, kommen [52].

Eine Umformung der Cyclobutanoneinheit zu Alkohol oder einem Diol vergleichbar zu Cyclohexanon, einem Ketonring mit 6 Kohlenstoffatomen, ähnlich dem Cyclobutanonring, wäre ebenfalls denkbar [53]. In diesem Fall wären die OH-Gruppen des entstehenden Alkohols über eine Umformung zu Trimethylsilyl (TMS)-Derivativen im Urin nachweisbar oder es würde nach Hydrolyse mit β -Glucuronidase zur Ausscheidung eines Glucuronidkonjugats kommen [51]. Jedoch konnten keine der vermuteten Metabolite gefunden werden. Ein alkoholisches Derivat wurde nur in den Kontrollen für Palmitinsäure nachgewiesen. Die in dieser Studie eingesetzte β -Glucuronidase (Rinderleber, Typ B-10) zeigte keine Umsetzung des 2dDCB zu einem spezifischen Metabolit. Eine Enzymspezifität wird nicht ausgeschlossen, so dass weiterhin die Annahme besteht, dass 2dDCB komplett metabolisiert wird. Der Nachweis der bisher noch unbekannten Verbindung steht noch aus. Sollte eine Öffnung des Cyclobutanonringes stattfinden, wäre das entstehende Molekül der Palmitinsäure sehr ähnlich und könnte auch auf eine vergleichbare Weise verstoffwechselt werden.

Aufgrund der Ergebnisse aus zwei neueren Studien an Ratten wird eine Akkumulation im Fettgewebe ausgeschlossen und eine schnelle Metabolisierung postuliert [51, 54]. Die Autoren der ersten Studie beschrieben, dass nach viermonatigem Verzehr von täglich 1 mg 2tDCB oder 2tDeCB nur ein geringer Teil (10^{-5} der verabreichten Menge) im Fettgewebe der Tiere wiedergefunden wurde. Trotz des geringen Fettgehaltes der Fäzes wurde ein deutlich größerer Anteil von 0,1-0,3% der Verzehrsmenge unverändert über die Rattenfäzes ausgeschieden.

Dies lässt zum einen darauf schließen, dass ein bedeutender Anteil der 2ACB adsorbiert und metabolisiert wurde und zum anderen, dass die Verbindungen während der Passage des Intestinaltrakts keiner Modifizierung unterliegen und in ihrer Struktur stabil sind [51, 54]. Darüber hinaus gab es Unterschiede in der Menge der gefundenen Einlagerungen für 2tDCB und 2tDeCB. Zum einen wurde vermutet dass das einfach ungesättigte Cyclobutanon (2tDeCB) weniger gespeichert wurde und zum anderen, dass höhere Metabolisierungsraten für dieses existieren, da nur ein Viertel der Menge des 2tDCB detektierbar war.

In der zweiten Fütterungsstudie wurde den Ratten täglich über einen Zeitraum von 5 Tagen jeweils 1 ml einer 5 mg/ml 2dDCB-Kornöl-Lösung verabreicht. Hier betrug die mittlere Wiederfindungsrate von 2dDCB $1,78 \pm 0,63$ mg in den Fäzes, welche einen Anteil von 3-11% der ursprünglich verfütterten Menge repräsentiert. Im Fettgewebe betrug der Anteil an 2dDCB 0,33% ($0,08 \pm 0,01$ mg). Zusätzlich zur Analyse von Fäzes und Fettgewebe auf 2dDCB wurde der Urin der Ratten gesammelt und auf 2dDCB sowie auf verschiedene Metabolite hin untersucht. Die Hypothesen, dass eine Konvertierung der Ketongruppe am 2dDCB zu einer Alkoholgruppe stattfindet oder eine Umsetzung durch β -Glucuronidasen erfolgt konnten jedoch nicht bestätigt werden.

1.3. Kolonkarzinogenese

Vor dem Hintergrund, dass 2ACB als Nahrungsmittelkontaminanten mit genotoxischem Potenzial einen Krebsrisikofaktor darstellen, sind die Verdauungsorgane und hier speziell der Dickdarm ein wichtiges Zielgewebe für Effekte. Daher ist es notwendig zunächst die Hintergründe der kolorektalen Kanzerogenese zu erläutern.

1.3.1. Molekulargenetische Grundlagen der Kanzerogenese

Bevor sich eine normale, gesunde Zelle zu einer malignen Zelle verändert, bedarf es mehrerer, mindestens vier bis sechs, spezifischer Mutationen in dieser Zelle [55-56]. Bei einer typischen Mutationsrate von 10^{-7} pro Gen und Zelle und einem Zellbestand von 10^{13} Zellen pro Person besteht nur eine geringe Wahrscheinlichkeit von $1:10^{29}$, dass diese Zahl erreicht wird. Das heißt, es bedarf sechs spezifischer Mutationen in einer Zelle, um eine Zelle in eine Tumorzelle zu verändern [57]. Diese Progression erfolgt über die Kombination von zwei allgemeinen Mechanismen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Mutationen die Zellproliferation verstärken und somit zu einer großen Zellpopulation führen, welche wiederum Ziel weiterer Mutationen wird.

Ein zweiter Weg betrifft die Stabilität des gesamten Genoms auf DNA- oder Chromosomenebene, welche mit einer erhöhten Gesamtmutationsrate einhergeht. Genomische

Instabilität in einfachen repetitiven Sequenzen ist zum Beispiel ein Marker für einige sporadische und erbliche Krebsformen des Dickdarms und gilt als ein sehr frühes Ereignis in der Tumorigenese [58]. Beide Mechanismen im Zusammenspiel bestimmen die stadienartige Entwicklung von Krebs über Gewebhyperplasie oder gutartiges Wachstum bis hin zu bösartigen Tumoren, deren genomische Instabilität sich in hochaberranten Karyotypen widerspiegelt.

Die Tumorigenese wird demnach als Mehrstufenprozess verstanden, in welchem verschiedene genetische Läsionen über Jahre hinweg akkumulieren und in einem malignen Phänotyp enden. Der Prozess wird in die Phasen ***Initiation***, ***Promotion*** und ***Progression*** unterteilt und wird von Veränderungen sowohl auf molekularer als auch auf Gewebeebene begleitet [59]. Das wichtigste genetische Ereignis beim Übergang einer gutartigen Läsion in die maligne Phase ist der Funktionsverlust von regulatorischen Proteinen infolge einer Aktivierung von Protoonkogenen oder einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutationen [60]. *Protoonkogene* und *Tumorsuppressorgene* gehören neben den so genannten *Mutatorgenen* zur Gruppe der Tumorgene und damit zu den Genen, die an der Steuerung der Zellproliferation beteiligt sind und welche im mutierten Zustand zur Krebsentstehung beitragen können [61].

1.3.2. Das Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese

Fearon und Vogelstein

Das 1990 von *FEARON UND VOGELSTEIN* vorgeschlagene Mehrstufenmodell zur Kolonkarzinogenese stellte erstmals den histologischen und morphologisch veränderten Phänotyp des Dickdarmepithels den genetischen Veränderungen gegenüber [55]. Es veranschaulicht unter dem Begriff Adenom-Karzinom-Sequenz den mehrstufigen Prozess der Kolonkarzinogenese als Abfolge verschiedener Mutationen, hauptsächlich in Tumorsuppressorgenen, aber auch in Protoonkogenen. Dabei können bereits heterozygot mutierte Tumorsuppressorgene den Phänotyp verändern. Das Modell besagt, dass sich die biologischen Eigenschaften des Tumors vorwiegend aus der Anzahl der angehäuften genetischen Veränderungen ergeben und nicht aus deren zeitlicher Abfolge.

In kolorektalen Neoplasien finden sich regelmäßig Verluste spezifischer chromosomaler Regionen auf einem der homologen Chromosomen, was dafür spricht, dass wichtige Tumorsuppressorgene mit diesen Regionen assoziiert sind. Zu den bereits durch *FEARON ET AL.* identifizierten Genen gehören das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 lokalisierte adenomatous polyposis coli - Gen (*APC*; 5q21-q22) und das mutated in colon cancer - Gen (*MCC*; 5q21-22), das kirsten rat sarcoma - Gen (*KRAS*; 12p12.1) auf dem kurzen Arm des

Chromosoms 12 sowie das auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisierte tumour protein 53-Gen (*TP53*; 17p13.1) [55]. Da eine Veränderung des *TP53* sehr eng mit dem Übergang vom Adenom zum Karzinomstatus verbunden ist, wird es als ein eher spätes Ereignis in der kolorektalen Kanzerogenese verstanden [62].

Hinzu kommen Veränderungen im *DCC*-Gen (deleted in colorectal carcinoma, 18q21.3) und in den Genen *SMAD2/SMAD4* (18q21.1). *SMAD4* ist in fast 50% der juvenilen Polyposis-Fälle mutiert [63-66].

Chromosomenzahl-Instabilität (CIN)

85% der sporadischen kolorektalen Tumore zeigen eine Vielzahl grober chromosomaler Veränderungen [67]. Die CIN charakterisiert die meisten humanen Tumoren und ist durch allelische Imbalancen wie Verlust oder Zugewinn definierter chromosomaler Regionen bzw. ganzer Chromosomen (Aneuploidie) gekennzeichnet [68-69]. *SHIH ET AL.* konnten in ihrer Studie über das Auftreten von CIN in frühen Tumorstadien in 90% der untersuchten Tumoren mindestens eine Imbalance in den Chromosomenregionen 1p, 5q, 8p, 15q und 18q nachweisen und postulierten CIN als ein sehr frühes Ereignis in der kolorektalen Neoplasie [68]. Darüber hinaus wird der CIN die gleiche Bedeutung bei der Krebsinduktion zugeschrieben wie den Punktmutationen [67]. Die molekularen Mechanismen der CIN und der damit wahrscheinlich verbundenen abnormalen Verteilung der Chromosomen während der Mitose sind noch ungeklärt. Ein hypothetischer Ansatz erwägt einen Zusammenhang zwischen einer Inaktivierung des *TP53* und dem zeitgleichen Auftreten einer starken Aneuploidy in Kulturzellen [70]. Weiterhin konnten in *TP53*-defizienten Zellen ein Arrest in der G2/M Phase und abnormale Spindelapparate nachgewiesen werden [70]. Doch sprechen einige Fakten gegen die Hypothese, dass Veränderungen im *TP53* der primäre Grund für chromosomeninstabile Zellen ist. Das wohl bedeutendste Gegenargument ist die Tatsache, dass *TP53* Mutationen wesentlich später im Karzinogeneseprozess auftreten und somit im Gegensatz zur CIN und Aneuploidie kein frühes Ereignis der Tumorigenese darstellen [71-72]. Darüber hinaus spricht dagegen, dass verschiedene Krebszelllinien mit *TP53* Mutationen existieren, welche neben einem stabilen diploiden Chromosomensatz eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) tragen [73-74].

Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Erstmals entdeckt beim Kolorektalkrebs stellt MSI einen zur CIN alternativen Weg der Entstehung verschiedener Tumorarten. Eine MSI tritt in ca. 13% der Kolonkrebsfälle und ähnlich häufig auch in endometrischen und gastrischen Karzinomen auf [75]. MSI wird durch

Mutationen in den Mismatch Reparatur (MMR) Genen, hauptsächlich *hMLH1* und *hMSH2* verursacht, was zu einer Störung des MMR-Systems führt [76]. Die MMR erkennt und repariert Basenfehlpaarungen, die, sofern sie nicht ordentlich repariert werden, mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Mutationen führen. Darüber hinaus werden durch MMR auch kleine Insertions-Deletions-Fehlpaarungen von bis zu acht Nukleotiden und durch Noxen induzierte DNA-Veränderungen erkannt und repariert. Ausgehend von einer fehlerhaften Kopie des Genoms während der Proliferation sind im Vergleich zu normalen Zellen 100-1000fach erhöhte Mutationsraten die Folge [77]. MSI ist durch eine genetische Veränderung der Längen so genannter Tandem Repeats oder Mikrosatellitensequenzen von 1-4 bp charakterisiert. Sie wurde zuerst für sporadischen Dickdarmkrebs und im HNPCC-Syndrom, der autosomal dominant erblichen Form des nicht polypösen Dickdarmkarzinoms, beschrieben [78-80]. Im Fall des *hMLH1* Gens wird als Ursache für das Ausschalten von Genen („*gene silencing*“) eine Promotormethylierung beschrieben, welche in 85% der Tumore mit ausgeprägter MSI zu finden ist [81].

1.3.3. Risikofaktoren für Dickdarmkrebs

Durch ihre hohe Inzidenz in den letzten Jahrzehnten sind Krebserkrankungen des Verdauungstraktes und speziell des Dickdarms nicht nur in den Industriestaaten von Bedeutung. Die Globalisierung und die damit einhergehende Ausbreitung der westlichen Kultur in den Drittländern führten auch in diesen zu einem starken Anstieg der Inzidenz für Kolorektalkrebs. Nach den vom Robert-Koch-Institut im Jahre 2008 veröffentlichten Daten der Dachdokumentation Krebs erkrankten 2004 zirka 230.500 Männer und 206.000 Frauen an Krebs. Mit 37.250 und 36.000 Neuerkrankungen bei Männern und Frauen zählt Darmkrebs bei beiden Geschlechtern zur zweithäufigsten Krebserkrankung [82]. Darüber hinaus zeigt die aktuelle Statistik des Deutschen Krebsforschungszentrums, dass Darmkrebs sowohl für Frauen als auch für Männer als zweithäufigste Krebstodesursache gilt. Im Vergleich der Todesursachen (nach der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, ICD) waren auch im Jahr 2007 Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems die häufigste Todesursache. Ihnen erlag fast jeder zweite Gestorbene (43,4 %). Bei jedem vierten Sterbefall (25,6 %) wurde eine Neubildung als Todesursache festgestellt [83].

Der Faktor Ernährung spielt eine besondere Rolle bei der Krebsentstehung und mit einem Anteil von 20 bis 42 % als Ursache krebsbedingter Erkrankungen zählt sie zu den wichtigsten vermeidbaren exogenen Risikofaktoren [84-85]. Ein Expertenkomitee der WHO postulierte bereits 1964, dass die häufigen und schweren Krebserkrankungen eine Folge des Lebensstils

und anderer Umweltfaktoren, einschließlich Umweltkarzinogene, hormonelle Faktoren und mangelhafte Ernährung seien und demzufolge vermeidbar wären [86]. *DOLL* und *PETO'S* Ergebnisse der Auswertung von Migrationsstudien aus dem Jahre 1981 zeigten, dass eine starke Korrelation zwischen dem nationalen Pro-Kopf-Verzehr bestimmter Nahrungsmittel und der Krebsrate besteht. Dies deutete bereits damals darauf hin, dass potenziell veränderbare Faktoren, wie die Ernährung oder Umweltfaktoren wie Rauchen, Reproduktionsverhalten, Infektionen und Arbeitsplatzexpositionen in der Entstehung und in der Prävention von Krebs von Bedeutung sein könnten, beziehungsweise, dass die unterschiedlichen Krebsraten zum Teil darauf zurückzuführen sind und somit zu 75-80% vermeidbar gewesen wären [87-88].

Die als „Western Style Diet“ bekannte Ernährungsweise ist hierbei von besonderer Relevanz. Charakteristisch sind sowohl der hohe Verzehr von raffinierten Kohlenhydraten, tierischen Fetten, vor allem aus rotem Fleisch, und damit die hohe Gesamtfettaufnahme, als auch ein geringer Verzehr an Obst, Gemüse und Ballaststoffen [89]. Zum einen trägt das im Fleisch enthaltene und in den Fäzes nachweisbare Häm des Eisens über die Fenton-Reaktion und zum anderen das Nahrungsfett über den Mechanismus der Lipidperoxidation zur Erhöhung des oxidativen Stresses bei [90-92]. Studien zur Zytotoxizität von Fäzeswasser zeigten, dass sie in Probanden mit einer fettreichen, calcium- und ballaststoffarmen Ernährung erhöht war [93-94]. Im Fokus stehen hier die sekundären Gallensäuren. Ein hoher Fettverzehr begünstigt zunächst die Bildung primärer Gallensäuren, welche zu 95% aktiv in den enterohepatischen Kreislauf absorbiert werden. Die übrigen 5% unterlaufen bakterielle Biotransformationsreaktionen durch die intestinale Mikroflora und werden zu sekundären Gallensäuren umgewandelt, die Krebs begünstigen können [93-94]. Darüber hinaus führt eine starke thermische Behandlung (Braten, Kochen, Grillen) von Fleisch zu einer chemischen Reaktion der Bestandteile Protein und Kreatin unter Bildung von heterozyklischen aromatischen Aminen, welche ein erhebliches genotoxisches und mutagenes Potenzial besitzen [95-96]. Im Gegensatz hierzu weist die Datenlage in Richtung einer wahrscheinlichen Risikoverminderung durch Obst, Gemüse und Vollkornprodukte [97-100]. Letztere enthalten einen hohen Anteil an Ballaststoffen. Infolge der Fermentation im Dickdarm durch Darmbakterien entstehen unter anderem die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat in einem groben Verhältnis von 60:20:20, wobei Butyrat aufgrund der bevorzugten Verstoffwechselung als Energielieferant von besonderer Bedeutung für das Wachstum und Überleben normaler Kolonozyten ist [101-105]. Butyrat ist einer der wichtigsten und am häufigsten untersuchten Ernährungsfaktoren. Ein Butyratmangel kann über die Stadien einer Mukosaatrophie und einer Schleimhautentzündung im chronischen Fall zur Ausbildung von

Dysplasien führen [106]. Dies wiederum erhöht das Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms [107]. Zusätzlich zeigt Butyrat spezifische wachstumshemmende Effekte in neoplastischen Kolonepithelzellen, welche auf ein chemoprotektives Potenzial dieser Verbindung hinweisen. Diese gegensätzlichen Effekte von Butyrat werden unter dem Begriff Butyrat-Paradoxon zusammengefasst. Darunter versteht man neben den Funktionen als Hauptenergieträger und Wachstumsstimulator in gesunder Kolonmukosa auch proliferationshemmende sowie apoptose- und differenzierungsfördernde Eigenschaften von Butyrat in kolorektalen Karzinomzellen *in vitro* [108].

Krebs ist eine genetische Erkrankung, wobei die meisten Krebs-verursachenden Mutationen somatischer Natur sind und im Verlauf der Karzinogenese im betreffenden Gewebe auftreten. Circa 10% der Dickdarmkrebsfälle sind auf vererbte Genmutationen in der Keimbahn zurückzuführen, welche zur Initiation der Karzinogenese beitragen [109]. Diese endogenen Faktoren stehen den durch die epidemiologische Datenlage bestätigten vielfältigen exogenen, vermeidbaren Einflussfaktoren mit tumorauslösender oder tumorfördernder Wirkung gegenüber.

DE LA CHAPELLES globale Betrachtung des genetischen Hintergrundes verweist im Fall von Kolonkrebs auf eine Interaktion von Risikofaktoren der Umwelt und den Genen [110].

1.4. Molekular-Zytogenetische Verfahren zur Chromosomenanalyse

1903 postulierten *SUTTON* und *BOVERI* als erste, dass die Chromosomen die Träger der Erbanlagen sind. Sie formulierten die Chromosomentheorie in der Weise, wie wir sie heute auch noch verstehen (auf den Chromosomen sind die Gene linear aufgereiht) [111]. Damit ist die Weitergabe der Erbinformation entscheidend an die Chromosomen gebunden. Die Entwicklung neuer Techniken innerhalb der letzten 50 Jahre machte es möglich, Veränderungen auf chromosomaler Ebene zu erkennen und diese Chromosomenstörungen spezifisch darzustellen [112]. Dabei umfassen Chromosomenanalysen die zahlenmäßige Darstellung der Chromosomen sowie die Darstellung der chromosomalen Bandenmuster bis hin zum Nachweis submikroskopischer Anomalien. Seit den 70er Jahren bedient sich auch die Routinediagnostik der Chromosomenanalyse zur Identifizierung numerischer und grobstruktureller Chromosomenaberrationen. Dabei gewinnt die Anwendung dieser molekularen Techniken zur früheren Erkennung von Entwicklungsstörungen in der Reproduktionsmedizin immer mehr an Bedeutung [113]. In der vorliegenden Arbeit dient die

Chromosomenanalyse der Detektion Substanz-induzierter chromosomaler Veränderungen in Kulturzellen.

1.4.1. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erlaubt die Lokalisation von DNA- oder RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen. Im Gegensatz zu anderen Hybridisierungsverfahren (Northern- oder Southern-Blot-Hybridisierung) wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischen Material (*in situ*) sichtbar [114-116]. Die aufwändige ursprüngliche radioaktive Markierung wurde 1986 durch die Methode der FISH abgelöst, welche erstmals von *PINKEL ET AL.* an menschlichen Chromosomen durchgeführt wurde [117]. Die Vorteile dieser nicht-radioaktiven Methode bestehen zum einen darin, dass durch die enzymatische Integration biotinylierter Nukleotide in die Sonden-DNA verschiedene Markierungen gleichzeitig in einem Experiment möglich sind und zum anderen, dass sie durch die zahlreichen zur Verfügung stehenden Antikörper-Detektionssysteme sehr flexibel ist. Ein weiterer Vorteil, welcher besonders in der Diagnostik von Bedeutung ist, liegt in der Schnelligkeit [113].

Wie in der Abb. 4 dargestellt werden bei der FISH mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotiden (DOP-PCR) die DNA-Sonden mit Markermolekülen (Fluoreszenzfarbstoff = direkte Methode oder mit Haptenen, wie Biotin, Digoxigenin = indirekte Methode) markiert und denaturiert [118]. Nach der Denaturierung der Ziel-DNA, welche als Metaphaseplatten oder Interphasekerne auf Objektträgern vorliegen, lagern sich die Sonden während der Hybridisierung an homologe DNA Sequenzen der unmarkierten Ziel-DNA an. Die indirekte Methode erfordert eine anschließende immuno-zytochemische Detektion der Hapten-markierten DNA mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgt über ein mit speziellen Filtersets ausgestattetes Epifluoreszenzmikroskop. Nach Anregung der Fluorochrome auf dem Präparat mit den entsprechenden Emissionswellenlängen werden die Photonen entweder zu einem Okular oder zu einer Kamera geleitet. Über das Kamerasystem können die FISH-Signale quantifiziert und mittels digitaler Bildverarbeitung analysiert werden. Hinsichtlich der Sensitivität dieser Methode sind nach *CHERIF ET AL.* und *VIEGAS-PEQUIGNOT ET AL.* im experimentellen Bereich minimal 900 bis 1300 Basenpaar-Fragmente detektierbar [119-120]. In der Routinediagnostik verwendet man jedoch nur bis zu 80 bis 120 kb große (BAC-) Sonden.

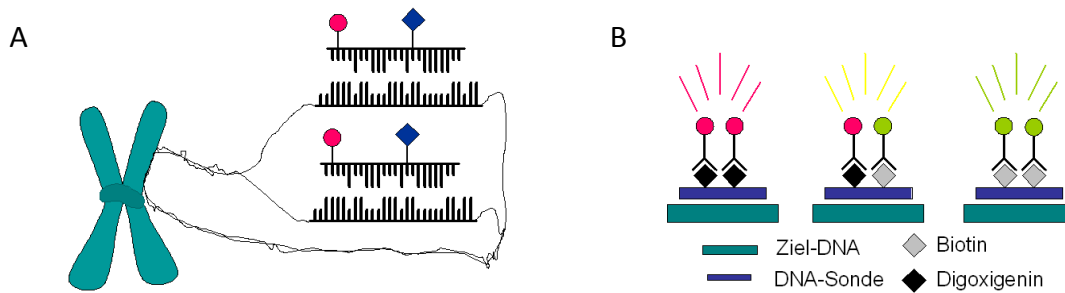


Abbildung 4: Schema der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit direkter Fluoreszenzmarkierung der Sonden-DNA (A) und der indirekten Markierung über Haptene (B)

1.4.2. 24-Farben-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Multicolor-, Multiplex-FISH)

Durch molekular-zytogenetische Methoden ermöglicht die FISH eine spezifische Markierung einzelner Chromosomen (Painting-Sonden), kleinsten Chromosomen-abschnitten (Zentromer-, Telomer-Sonden) sowie einzelnen Genen (Gen-Sonden) in der Metaphase. Weitergehend findet mit der Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH) oder auch [Multi-Color-FISH](#) ein neues Verfahren der Chromosomenanalyse Anwendung, welches die simultane Darstellung aller Chromosomen in verschiedenen Farben erlaubt [121]. Hierfür werden Painting-Sonden verwendet, welche über Mikrosezierung (Mikroskopie-gestützte Isolierung einzelner Chromosomen aus fixierten und gebänderten Metaphaseplatten mit Hilfe von dünnen Glasnadeln) gewonnen werden.

Die für eine *in situ* Hybridisierung notwendige DNA-Menge von 200-300 ng wird aus der geringen Menge von durchschnittlich 260 fg Chromosomen-spezifischer DNA über eine DOP-PCR hergestellt. Durch den Einbau Fluorochrom- oder Hapten-gekoppelter Nukleotide wird die Sonden-DNA markiert. Die Besonderheit der M-FISH besteht darin, dass 5 verschiedene Fluorochrome ausreichen, um alle 24 Chromosomen individuell anzufärben.

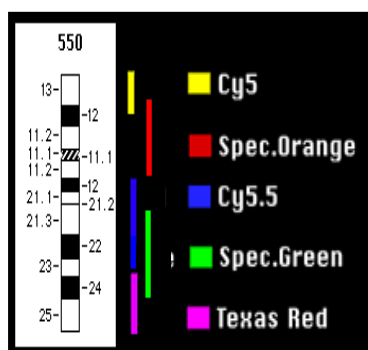


Abbildung 5: Multicolor-Labelschema für das Chromosom 17

Hierfür bedient man sich der kombinatorischen Markierungstechnik (Abb. 5). Nach der Formel für die Anzahl brauchbarer boolescher Kombinationen $2^N - 1$ für N Fluorochrome gilt für ein Fluorochrom A: 1 brauchbare, für zwei Fluorochrome A und B: 3 brauchbare Kombinationen (A/A; A/B; B/B). Fünf Fluorochrome können in 31 verschiedenen Kombinationen eingesetzt werden.

Im Anschluss an die Hybridisierung der Sonden-DNA mit der Ziel-DNA erfolgt der fluoreszenzmikroskopische Nachweis. Mit Hilfe der kombinatorischen Markierungstechnik

und des Multi-Color-Banding ist es möglich die Zusammensetzung und die Struktur der Chromosomen zu analysieren um Veränderungen, wie den Verlust oder den Zugewinn von Erbmaterial sowie Umlagerungen von Chromosomenteilen (Translokationen), auf Einzelzellebene zu charakterisieren. Dadurch wird eine Translokation, zum Beispiel in der Diagnostik von fetalen Zellen oder Tumorzellen, einfach erkennbar. Aus der zytogenetischen Abklärung von chromosomalen Strukturveränderungen (molekularzytogenetische Diagnostik) ergeben sich für die FISH Einsatzmöglichkeiten in der pränatalen und postnatalen Diagnostik, in der Tumorzytogenetik und vor allem in der Genkartierung [113].

1.5. Ziele und Aufgabenstellung

Als 1981 die Organisation für Ernährung und Landwirtschaft der Vereinten Nationen (FAO) sowie die Internationale Atomenergiebehörde (IAEA) und die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Unbedenklichkeit der Bestrahlung von Lebensmitteln bis zu einer mittleren Dosis von 10 kGy feststellten, war es technisch nicht möglich, 2ACB als radiolytische Produkte nachzuweisen. Erst zu Beginn der 90er Jahre wurde deren einzigartiges Vorkommen in bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln zum spezifischen Nachweis dieser Konservierungsmethode genutzt [36, 38]. Gleichzeitig stellte sich die Frage nach der toxikologischen Relevanz dieser als „Unique Radiolytic Products“ bezeichneten zyklischen Verbindungen für den Verbraucher, der durch den Verzehr bestrahlter Lebensmittel gegenüber diesen Lebensmittelkontaminanten exponiert wird.

Ziel der Arbeiten war es, die drei strukturanalogen 2-Alkylcyclobutanone **2-Dodecyl-**, **2-Tetradecenyl-** und **2-Tetradecylcyclobutanon** sowie dessen Oxidationsprodukt, das **4-Tetradecyl- γ -butyrolakton**, als spezifische Produkte der Strahlenkonservierung fetthaltiger Lebensmittel in humanen Dickdarmzellen molekular-toxikologisch zu charakterisieren und die gesundheitliche Relevanz der Befunde zu bewerten.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die molekulartoxikologische Charakterisierung der Cyclobutanonverbindungen in gesunden Zellen des humanen Dickdarmepithels und in Zellen mit besonderen Empfindlichkeitseigenschaften. Für die Untersuchungen wurden daher Zellen eines kolorektalen Mikroadenoms (LT97) sowie frisch isolierte primäre Kolonepithelzellen mit ausgewählten 2ACB behandelt und hinsichtlich ihrer Vitalität und DNA-Integrität beurteilt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, wie die bisher gewonnenen Ergebnisse zum Wirkpotenzial von 2dDCB und 2tDCB sowie 2tDeCB in humanen Kolontumorzellen (HT29, HT29clone19A) und Dickdarmzellen der Ratte im Vergleich zu gesunden und wenig transformierten Zellen des menschlichen Kolons als Zielzellen ernährungsbedingter Tumore zu bewerten sind.

Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

Wirken die Substanzen unter akuten Expositionsbedingungen toxisch?

Erfassung der effektiven Dosen (Zeit- und Konzentrationsbeziehungen) und Bestimmung der EC_{50} in humanen Kolontumorzellen (HT29clone19A), in primär-ähnlichen Dickdarmzellkulturen (LT97), die ein Modell für die gesunde beziehungsweise kaum transformierte Darmschleimhaut sind und in frisch isolierten primären Kolonzellen aus Spendergeweben durch Ermittlung der Vitalitätsraten während akuter Exposition der Zellen gegenüber allen 2ACB.

Wirken die Testsubstanzen in humanen Kolonzellen DNA-schädigend?

Untersuchung der Sensitivität von Kolonepithelzellen unterschiedlichen Transformationsgrades hinsichtlich DNA-schädigender Wirkung nicht zytotoxischer Konzentrationen der 2ACB im Comet Assay.

Führt die Exposition mit den Substanzen zu vererbaren Schäden auf chromosomaler Ebene und mit welchen phänotypischen Auswirkungen sind sie verbunden?

Untersuchung des klastogenen Potenzials des aktivsten 2ACB durch Erfassung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen in der Tochtergeneration proliferierender Adenomzellen (LT97).

Ermittlung der mutagenen Konsequenz der durch 2ACB induzierten DNA-Schäden durch den Nachweis von spezifischen Mutationen im Gen des Tumorsuppressorproteins TP53 in der Tochtergeneration proliferierender Adenomzellen (LT97).

Werden die Substanzen durch das Glutathion/Glutathion *S*-Transferase – System metabolisiert?

Untersuchung des Einflusses eines modulierten GST/GSH-Enzymsystem (GST-Induktion durch Butyrat, GSH-Depletion durch Buthionin-(S,R)-Sulfoximin) auf die Genotoxizität der 2ACB in Kolonzellen unterschiedlichen Transformationsgrades.

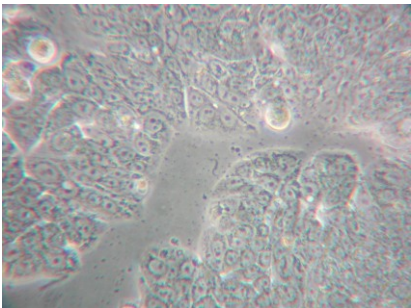
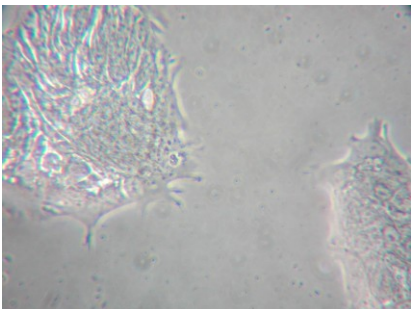
Modulation des Glutathionstatus der Kolonzellen nach akuter Exposition gegenüber 2ACB.

2. METHODEN

2.1. Verwendete Zelllinien

Die folgende Tabelle (Tab. 2) gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien und deren charakteristischen Eigenschaften.

Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Zelllinien und deren Merkmale

Zelllinie	Merkmale
HT29clone19A 	<i>AUGERON UND LABOISSE</i> [122] isolierten 1984 den durch Behandlung mit 5 mM Natriumbutyrat rückdifferenzierten Zellklon HT29clone19A aus der parentalen, permanent undifferenzierten HT29 Zelllinie [123]; mehrschichtiges, adhärentes Wachstum mit einer Generationszeit von 24 h; polyploider Chromosomensatz; stabiler, aber hoch aberranten Karyotyp [124-126]
LT97 	2002 von <i>RICHTER ET AL.</i> aus dem kolorektalen Mikroadenom einer 47-jährigen FAP-Patientin isoliert [127-128]; repräsentieren permanente Adenomzelllinie epithelialen Ursprungs; Genotyp durch LOH beider Allele des Tumorsuppressorgens <i>APC</i> und durch ein mutiertes <i>K-Ras</i> Onkogen gekennzeichnet, <i>TP53</i> Wildtyp; langgestreckte Form; dreidimensionales Wachstum; exponentielles Wachstum von Zellaggregaten (5-10 Zellen) in serumhaltigem Medium (mit TGF α , EGF, Insulin, HGF); autokrine TGF α -Sekretion

Für die Bearbeitung der Fragestellungen wurden verschiedene Kolonzelllinien verwendet, welche sich in ihrem Differenzierungs- und Transformierungsgrad unterscheiden. Diese Modellsysteme repräsentieren verschiedene Eigenschaften von Kolonepithelzellen hinsichtlich ihres Empfindlichkeitsstatus. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Brutschrank (37°C; 95% Luftfeuchte; 5% CO₂). Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-air-flow-Werkbank auf einer 37°C warmen Wärmeplatte durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur vortemperierte. In

regelmäßigen Abständen wurde die Zellkultur auf Mykoplasmen getestet. Zum einen wurde ein Mykoplasmentest mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) [129], zum anderen ein Mykoplasmentest auf PCR-Basis durchgeführt (Mycoplasma-PCR-Detection-Kit VenorGeM, Minerva Biolabs, Berlin).

2.2. Primäre Kolonzellen

Die hier als Primärzellen bezeichneten Kolonzellen wurden aus humanem Dickdarmgewebe isoliert. Die Gewebeproben wurden von der Allgemeinen und Viszeralen Chirurgie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena nach Genehmigung durch die Ethikkommission der FSU und mit dem Einverständnis der Patienten zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um makroskopisch gesundes, histologisch unauffälliges Dickdarmgewebe, welches infolge einer krankhaften Veränderung des Darmes (Karzinom, Adenom, Divertikulitis, chronische Entzündungen wie Morbus Crohn) entnommen, danach in HBSS aufbewahrt, auf Eis transportiert und innerhalb einer Stunde nach der Entnahme aufbereitet wurde. Die weitere Aufarbeitung des operativ entfernten Gewebes zu Einzelzellen für eine experimentelle Verwendung erfolgte analog der nach *SCHÄFERHENRICH ET AL.* beschriebenen Methode der perfusionsunterstützten mechanischen Disaggregation mit anschließendem enzymatischen Verdau [130]. Die Abb. 6 zeigt zusammenfassend die einzelnen Aufarbeitungsschritte in eisgekühltem HBSS-Puffer. Für die hier vorgestellten Untersuchungen war es in jedem Falle notwendig Einzelzellen zu gewinnen. Die Aufarbeitung erfolgte sofort nach Erhalt der Probe oder die Gewebestreifen wurden über Nacht in HBSS auf Eis im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

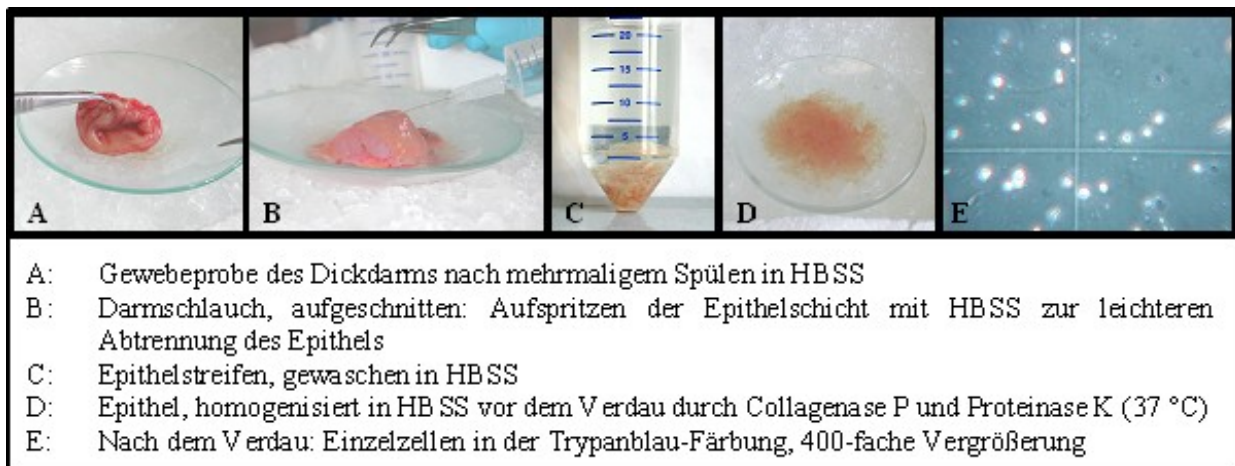


Abbildung 6: Aufarbeitung von humanem Dickdarmgewebe zu Einzelzellen nach Schäferhenrich et al. [107]

2.3. Charakterisierung der Zelllinien

Für DNA- und Chromosomen-basierende Untersuchungsansätze wurde an HT29clone19A Zellen eine Karyotypbestimmung mit Hilfe der 24-Farben-FISH-Technik durchgeführt. Darüber hinaus wurde für die LT97 Zelllinie eine Wachstumskinetik erstellt um die optimalen Inkubationsbedingungen zu bestimmen.

2.3.1. Bänderungs-Zytogenetik und Molekulare Zytogenetik zur Bestimmung des Karyotyps

Zelllinie: Differenzierter Subklon von HT29 (HT29clone19A)

Für die Karyotypisierung wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitsbereich Zytogenetik und Karyotypevolution (Lehrstuhl für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena, Leitung Dr. Anja Weise) Metaphase-Chromosomen mittels zytogenetischer Standard-Methoden hergestellt. Hierfür wurden die proliferierenden Zellen mit hypotoner Lösung und anschließend mit Fixativ (Methanol-Eisessig 3:1) behandelt. Die resultierende Chromosomen-Suspension wurde mittels Lufttrocknungs-Methode auf Objektträger aufgebracht [131]. Um komplexe Umordnungen in der Zelllinie zu untersuchen, wurde die 24-Farben-FISH unter Einsatz menschlicher „whole chromosome painting“ Sonden [132] und das Multicolor Banding (MCB) Verfahren [133] eingesetzt. Darüber hinaus wurden kommerziell erhältliche lokusspezifische FISH-Sonden in Ein- bis Zwei-Farben-FISH Experimenten verwendet. Die genaue Durchführung der FISH-Technik wird im Anhang näher beschrieben.

2.3.2. Wachstum und Generationszeiten der verwendeten Zelllinien

Zelllinie: Mikroadenomzellen des Kolons (LT97);

Wachstumskinetik: LT97

Die Zellen wurden in glutaminhaltigem MCDB-Medium, supplementiert mit FCS (2%) und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (1%), unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Aussaat der Zellen in 12-well-Platten, wurden nach jeweils 24 h Kultivierungsdauer 3 wells mit Trypsin geerntet und in einem Doppelansatz ausgezählt. Es wurden Daten aus einem Experiment über 144 h gesammelt und ausgewertet.

2.4. Herstellung der Stammlösungen der Testsubstanzen

Für die Untersuchungen kamen 2dDCB, 2tDCB, 2tDeCB und 4tDBL zum Einsatz. Die Wahl der Konzentrationen der zu testenden Verbindungen richtete sich nach **(1)** deren maximalen Löslichkeit in Ethanol (EtOH), **(2)** der maximalen nicht toxischen EtOH-Konzentration und **(3)** den bekannten effektiven Konzentrationen (0,25-1,25 mg/ml bzw. 1,05-6,29 mM) für

2dDCB [33]. Da einzig für das 4-Tetradecyl- γ -Butyrolakton (4tDBL) eine Löslichkeitsgrenze von 8,92 mg/ml bekannt war und ist [134] wurde angenommen, dass die übrigen 2ACB ähnliche Löslichkeitseigenschaften haben sollten. Weiterhin wurde berücksichtigt, dass im Rahmen der Studien des INTERREG II Projektes [23] mit 2ACB-Stammlösungen der Konzentration 5 mg/ml EtOH gearbeitet wurde. Dadurch wurde nach Zugabe von 20 μ l dieser pro Milliliter Kulturüberstand eine maximale EtOH-Konzentration von 2% im Inkubationsansatz erreicht. Aus Vorversuchen war bekannt, dass eine Endkonzentration von maximal 4% als Lösungsmittelkontrolle in der Suspension von HT29 Kolontumorzellen (2×10^6 /ml) zu keiner signifikanten Veränderung der Zellvitalität führt, so dass diese Menge als maximale Zugabemenge für die Lösungen mit den Testsubstanzen definiert wurde [135]. Für die Versuche wurden 25-fach konzentrierte Stammlösungen der Testsubstanzen in reinem, zusätzlich getrocknetem EtOH hergestellt und den Zellsuspensionen zugesetzt. Die höchste Konzentration bei einem EtOH-Anteil von 4% betrug für 2dDCB, 2tDCB sowie für 2tDeCB 2097 μ M. Als Kontrollen dienten Zellen, welche mit RPMI 1640 (Unbehandelte Kontrolle), 4-Hydroxy-2-nonenal (Positivkontrollen: 100, 150 μ M 4-HNE) und EtOH (Lösungsmittelkontrolle) inkubiert wurden. Die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen sind in der Tab. 3 zusammengefasst. 4-HNE wurde in allen Versuchsreihen als positive Kontrolle mitgeführt. Da dieses Lipidperoxidationsprodukt sowohl zytotoxische und genotoxische, als auch Glutathion-modulierende Eigenschaften besitzt, welche in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark ausgeprägt sind, wurde es als Vergleichssubstanz zur Beurteilung der Cyclobutanon-induzierten Effekte eingesetzt [135].

Tabelle 3: Bezeichnung der Kontrollen und ihre Abkürzungen

Kontrolle	Behandlung	Abkürzung
Unbehandelte Kontrolle	RPMI1640	UK
Lösungsmittelkontrolle	EtOH (4%)	0
Positivkontrolle I	4-HNE (100 μ M)	PKI
Positivkontrolle II	4-HNE (150 μ M)	PKII

2.5. Zytotoxizität der Cyclobutanonverbindungen

Die Bestimmung der akuten toxischen Effekte der Verbindungen an subkonfluent gewachsenen Kulturzellen sowie an frisch isolierten primären humanen Kolonzellen nach einer Exposition von 0 - 120 min erfolgte mit dem Trypanblau-Ausschlusstest. Dieser ermöglicht es, nicht vitale Zellen aufgrund ihrer Membranschädigung von vitalen Zellen zu

unterscheiden und gleichzeitig die Zellzahl der vorliegenden Suspension zu bestimmen [136]. Die intakte Zellmembran vitaler Zellen schließt den Farbstoff aus, während er durch die geschädigte Plasmamembran nekrotischer und auch spät apoptotischer Zellen hindurch diffundiert und somit das Zytoplasma blau bis violett anfärbt. Die im Lichtmikroskop blau erscheinenden abgestorbenen Zellen sind eindeutig von den ungefärbten lebenden zu unterscheiden.

Für die Inkubation mit den Testsubstanzen wurden Zellsuspensionen der Dichte 2×10^6 Zellen je Milliliter RPMI 1640-Minimalmedium (ohne Serumzusatz) eingesetzt. In jedem Ansatz wurde mit einem Gesamtvolumen von 500 μl (480 μl RPMI + 20 μl der 25-fach konzentrierten 2ACB-Gebrauchslösung in EtOH) Suspension gearbeitet. Für die Messung der zytotoxischen Effekte der 2ACB, in diesem Fall die substanz-induzierte irreversible Schädigung der Zellmembran, wurden Konzentrationen von 150 - 2097 μM des 2dDCB, 2tdDCB und 2tDeCB und 150 - 1260 μM eingesetzt. Als Kontrollen wurden Zellen mit 4% Ethanol-Zusatz (0 μM) und in reinem RPMI (UK) mitgeführt. Als Positivkontrollen (PK) dienten 4-HNE-behandelte Zellen. Die Inkubation erfolgte für 30 bis 120 min im Thermomixer (37°C, 350 rpm). In einem Zeitabstand von 30 min wurden die Ansätze mit einer Pipette resuspendiert, je 20 μl für die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung abgenommen und die Proben sofort auf Eis gestellt und mit gleichem Volumen Trypanblau versetzt. Diese 1:2-Verdünnung wurde auf eine geeichte Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop (AXIOVERT 25) ausgewertet. Dafür wurden mindestens 100 Zellen erfasst und daraus der prozentuale Anteil vitaler Zellen nach unten beschriebenen Gleichungen bestimmt.

Berechnung der Zellzahl/ml Suspension:

$$\text{Zellzahl (x10}^6\text{)/ml} = \text{Zellzahl/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Berechnung der Vitalität der Zellen:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{ungefärbte, vitale Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl (= vitale + tote Zellen)}}$$

Die statistische Überprüfung von Veränderungen der Zellvitalität gegenüber der Ausgangsvitalität (0 min) in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration erfolgte mittels

einer Two-way Repeated Measures (RM) ANOVA mit Bonferroni post hoc-test. Wenn nicht anders beschrieben, wurden hierfür die absoluten Werte von mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen zugrunde gelegt.

2.6. Genotoxizität der Cyclobutanonverbindungen

Der Nachweis der Genotoxizität erfolgte mittels Comet Assay. Dieser Test basiert auf der Technik der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese und dient als Genotoxizitätstest der schnellen, einfachen und sensitiven Bestimmung des genotoxischen Potenzials einer Testsubstanz. Er wurde von *ÖSTLING UND JOHANSON* entwickelt und ermöglicht die Quantifizierung der DNA-Migration auf der Einzelzellebene [137]. Der Nachweis eines DNA-schädigenden Effektes der untersuchten Verbindungen erfolgte mit der alkalischen Version des Comet Assay nach *SINGH ET AL.* [138]. Die mit den Testsubstanzen inkubierten und in Low-Melting-Agarose (LMA) aufgenommenen Zellen wurden auf einen mit Normal-Melting-Agarose (NMA) vorbeschichteten Objektträger aufgetragen. Im Anschluss an eine durch das nicht-ionische Detergens Triton-X 100 unterstützte Hochsalz-Lyse erfolgt die Elektrophorese bei pH 13. Die infolge der Lyse strukturell veränderte, in Form von langen, umeinander gewundenen Schleifen vorliegende und als Nucleoid bezeichnete doppelsträngige DNA wird im alkalischen Milieu denaturiert [139]. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die durch die Denaturierung entstandenen negativ geladenen DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Länge zur Anode. Hierdurch können neben fehlerhaft reparierten Basen auch die durch die Testsubstanz induzierten DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, DNA-Addukte sowie alkalilabile Stellen erfasst werden. Nach der Elektrophorese werden die Objektträger neutralisiert und die DNA mit einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. In der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung stellt sich die intakte DNA als stark fluoreszierender Kreis dar. Das Bild der aufgetrennten kürzeren DNA-Fragmente, DNA-Schleifen oder -Fäden im Agarosenetzwerk ähnelt einem Schweif und zusammen mit der kompakten Kern-DNA erscheinen die Strukturen wie ein Komet, woraus sich der Name dieser Technik ableitet. Der prozentuale Anteil der DNA im Schweif (Tail Intensity) wurde als fluoreszenzmikroskopischer Auswertungsparameter gewählt.

2.6.1. Alkalischer Comet Assay zur Untersuchung der Genotoxizität in Kolonzellen unterschiedlicher Transformationsstadien

Nach aktuellen Richtlinien für toxikologische Untersuchungen mit dem Comet Assay sollte bei der Ergebnisinterpretation eine Beeinflussung der genotoxischen Effekte der Testsubstanzen durch zytotoxische Wirkungen berücksichtigt bzw. ausgeschlossen werden

[140]. Dementsprechend wurden im Comet Assay Konzentrationen eingesetzt, welche in vorangehenden Untersuchungen zur Zytotoxizität keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Zellen ($\leq 70\%$) zeigten [141].

Die Vorbereitung der einzelnen Zelltypen (Kultivierung, Aufarbeitung, Inkubation) entspricht den standardisierten Versuchsbedingungen [142] und soll hier nur verkürzt vorgestellt werden. Im Anhang können zusätzliche Erläuterungen nachgelesen werden.

Zur Untersuchung der genotoxischen Effekte nach 30- und 60-minütiger Exposition der Zellen gegenüber den zu testenden Verbindungen erfolgte nach der Ernte der subkonfluent gewachsenen Zellen (oder primären Kolonzellen) die Inkubation von 1×10^6 Zellen in 480 μl RPMI mit 20 μl der jeweiligen Testsubstanz (25-fach) bei 37°C in Eppendorfgefäßen. Nach der Exposition der Zellen gegenüber den Testsubstanzen und den Kontrollen erfolgten die Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau und die Einbettung der Zellen in Agarose auf vorbeschichtete Objektträger. Nach Durchführung des Comet Assays wurde die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen angefärbt. Die Auswertung des prozentualen Anteils gewanderter DNA im Kometenschweif erfolgte über das Comet Assay II-Imaging System von Perceptive Instruments. Die induzierten DNA-Strangbrüche wurden als „Tail Intensity“, die Fluoreszenzintensität der DNA im Schweif, in Prozent (%) gemessen.

2.7. Modulation des Glutathion Status und dessen Einfluss auf das Wirkpotenzial der 2-Alkylcyclobutanone

Hierfür wurden HT29lone19A, LT97 und primäre Zellen mit 2dDCB in den Konzentrationen 1049 und 2097 μM für 30 und 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend der Gehalt an zellulärem reduzierten Glutathion bestimmt. Die Ergebnisse sollten darüber Aufschluss geben, ob Glutathion potenziell an der Metabolisierung der 2ACB beteiligt ist und ob die Höhe des basalen Glutathiongehaltes maßgeblich die Toxizität der 2ACB in den verschiedenen Kolonzelltypen beeinflusst.

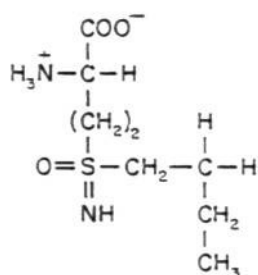
2.7.1. Basale Glutathiongehalte der verwendeten Kolonellsysteme

Zur Beurteilung der Rolle des Glutathions (GSH) im Stoffwechsel der 2ACB in humanen Kolonzellen war es notwendig die GSH-Gehalte sowohl der transformierten als auch der nicht transformierten Zellen zu kennen. Die Bestimmung des zellulären Gehaltes an reduziertem Glutathion erfolgte kolorimetrisch unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Calbiochem®) bei einer Wellenlänge von 400 nm. Hierfür wurden die Zellen in 5%-iger Metaphosphorsäure lysiert, das Protein durch Zentrifugation abgetrennt und das reduzierte GSH über eine zweistufige Farbreaktion zum Thion umgewandelt und photometrisch

gemessen. Die Berechnung des absoluten Gehaltes an GSH in nmol erfolgte auf Basis der Zellzahl.

2.7.2. Hemmung der Glutathion-de-novo-Synthese in den Kolontumorzellen HT29clone19A

Eine experimentelle Depletion des zellulären GSH in Tumorzellen im Vorfeld einer Exposition dieser gegenüber 2dDCB und 2tDCB und eine anschließende Untersuchung der DNA-Strangbrüche sollte zeigen, ob sich die Empfindlichkeit epithelialer Kolonzellsysteme



gegenüber den 2ACB eventuell auf den GSH Status zurückführen lässt. Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass das Methionin-Sulfoximin Analogon S-n-butyl Homocystein Sulfoximin (Buthioninsulfoximin, BSO; Abb. 7) in HT29 Zellen konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Reduktion des zellulären GSH führt [135, 143].

Abbildung 7: Strukturformel von Buthionin-(S,R)-Sulfoximin

Diese Reduktion basiert auf der Hemmung des geschwindigkeits-bestimmenden ersten Schrittes der Glutathionsynthese in Säugerzellen, welcher durch die γ -Glutamylcystein Synthetase katalysiert wird [144]. Analog dieser Studie wurden HT29clone19A Zellen mit BSO behandelt um einen GSH-Mangel zu induzieren.

2.7.3. Induktion von 2ACB-induzierten DNA-Schäden mit dem Comet Assay in GSH-depletierten HT29clone19A Zellen

Subkonfluent in 6-well-Platten gewachsene HT29clone19A Zellen wurden für 18 h mit 100 μ M BSO inkubiert. Nach Hemmung der intrazellulären GSH-Neusynthese wurde der Einfluss des Glutathiongehaltes auf die (geno)-toxischen Eigenschaften von 2dDCB und 2tDCB untersucht. Hierfür wurde anschließend an die Depletion des GSH Status mit den genannten 2ACB der Comet Assay durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten mit 150 μ M 4-HNE behandelte Zellen. Parallel hierzu erfolgte anhand von zurückgestellten Proben BSO-behandelter und nicht behandelter Kontrollzellen die Quantifizierung des GSH-Gehaltes.

2.7.4. Modulation des Glutathionstatus durch 2-Dodecylcyclobutanon

Die Versuchsbedingungen für die Untersuchung der 2ACB basieren auf einer früheren Arbeit mit HT29 Zellen zur Modulation des Glutathions, welches an der Entgiftung radikalischer und genotoxischer Substrate beteiligt ist, mit der in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendeten genotoxischen Modellsubstanz 4-HNE [135]. Um die Metabolisierung von 2dDCB mittels einer Konjugation mit Glutathion nachzuweisen, wurden HT29clone19A und LT97 Zellen

sowie frisch isolierte Einzelzellen aus humanem Spendergewebe in einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml für 30 und 60 min mit 2dDCB in den Konzentrationen 1049 und 2097 μM bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und auf ihren Gehalt an reduzierten GSH hin untersucht. Es wurden je 3 Versuche durchgeführt, als Kontrolle diente das Lösungsmittel EtOH in einer Konzentration von 4%. Die Vitalitäten wurden mit Trypanblau bestimmt.

2.8. Nachweis klastogener Effekte von 2-Dodecylcyclobutanon in proliferierenden LT97 Adenomzellen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Ziel dieser Untersuchungen war es zu klären, ob 2dDCB das Erbgut auf chromosomaler Ebene schädigt. Der Versuchsansatz basiert auf der Richtlinie 473 der Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Diese Vorschrift beinhaltet den standardisierten Versuchsablauf zur Kultivierung, Inkubation und Aufarbeitung der zu untersuchenden Zellen sowie Vorschriften für die Auswahl geeigneter Kontrollen [145].

Für diese Untersuchungen wurden proliferierende, subkonfluent gewachsene, 7 bis 14 Tage alte LT97 Adenomzellen verwendet. LT97 Zellen erfüllen das Kriterium eines stabilen Karyotyps und die Dauer eines Zellzyklus ist bekannt. Darüber hinaus repräsentieren sie adenomatöse präneoplastische Läsionen des Dickdarmepithels und sind somit wichtige Zielzellen der Krebsprogression. 2dDCB wurde in den Konzentrationen 30, 75, und 150 μM auf die adhärente LT97 Kultur gegeben, wobei der Lösungsmittelanteil 0,3% EtOH betrug. Als Positivkontrolle wurden Ethylmethansulphonat (EMS), eine stark alkylierende und damit Chromosomenaberrationen induzierende Verbindung in der Konzentration von 1 mM und zusätzlich 4-HNE als Vergleichssubstanz in einer Konzentration von 150 μM , verwendet [142, 146]. Nach der Isolierung der Metaphasen schloss sich die 24-Farben FISH-Analyse an [147]. Diese wurde von unseren Kooperationspartner (Institut für Anthropologie und Humangenetik, wissenschaftliche Leitung Prof. Dr. U. Claussen) durchgeführt.

2.8.1. Vorbereitung der LT97 Zellen auf den Mutagenitätstest nach OECD 473

Nach standardisierter Aussaat in 25 cm^2 Zellkulturflaschen wurden die subkonfluent gewachsenen Zellen für 6 h mit 2dDCB und den oben genannten Kontrollen inkubiert. Als unbehandelte Kontrolle dienten in MCDB-Medium kultivierte Zellen. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen für weitere 46 h auf normales Kulturmedium zurückgesetzt. Nach insgesamt 52 Stunden wurde das Spindelgift Colcemid auf die Zellen aufgebracht. Die Gewinnung der Chromosomen und die Metaphasepräparation erfolgten nach *CLAUSSEN ET AL.* [148]. und sind im Anhang detailliert erläutert.

2.8.2. 24-Farben-FISH zur Bestimmung struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen

Die Karyotypisierungen der Proben mittels 24-Farben-FISH sowie deren Bildanalyse erfolgten durch Frau Dr. Anja Weise vom Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena. Anhand dieser Daten erfolgten die Darstellung und die Interpretation der Chromosomenschäden.

Bei der 24-Farben-FISH Technik wurde mit Ganzchromosomensonden gearbeitet, welche bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einer Kombination aus mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden waren. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte an einem mit speziellen Filtersets ausgestatteten Epifluoreszenzmikroskop. Über ein an das Mikroskop gekoppeltes Kamerasystem wurden die FISH-Signale quantifiziert und mittels digitaler Bildverarbeitung analysiert.

2.8.3. 2-Farben-FISH zum Nachweis spezifischer Schäden im Tumorsuppressorgen *TP53*

In einer weiterführenden Untersuchung wurden aus den für die 24-Farben-FISH Analyse verwendeten Proben Daten zur spezifischen Schädigung des *TP53* Gens (17p13), generiert. Hierfür wurde eine 2-Farben-FISH Analyse durchgeführt. Bei diesem Verfahren der FISH wurde nur mit 2 unterschiedlich markierten Sonden gearbeitet. Um die Auswertung der *TP53*-Signale zu erleichtern, wurde der p-Arm des Chromosoms 17 mit Hilfe einer durch Mikrodissektion selbst hergestellten biotinylierten pcp-Sonde (partial chromosome painting-probe) hybridisiert und anschliessend über eine Biotin-Streptavidin-FITC-Antikörperreaktion detektiert. Um die genspezifischen Veränderungen des *TP53* zu untersuchen, wurde mit einer 145 kb großen, kommerziellen lokusspezifischen *TP53*-Sonde (LSI p53, SpectrumOrange; Vysis Inc., Downers Grove, IL 60515) gearbeitet. Diese Sonde ist bereits direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff SpectrumOrange markiert. Die genaue Durchführung ist im Anhang beschrieben. Die Detektion und Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte ebenfalls computergestützt mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung.

2.9. Statistik

Die statistische Überprüfung der Effekte durch die Testsubstanzen (2ACB, PK I, PK II) erfolgte jeweils gegen die EtOH-Kontrolle (0) mittels einer One-way ANOVA in Kombination mit dem Dunnett's post hoc test. Wichtige Effekte sind der Einfluss auf die Vitalität der Zellen und die Veränderung der DNA-Integrität durch die Testsubstanzen. Mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-tests mit Welch's Korrektur wurde überprüft ob EtOH (0)

im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UK) zu einer Beeinträchtigung der oben genannten Parameter führte. Zusätzlich wurden die um einen (möglichen) EtOH-Effekt bereinigten Daten als „Relative DNA-Schäden“ dargestellt und hinsichtlich des Einflusses der Zeit (30 gegen 60 min) auf die Höhe der messbaren DNA-Schäden mittels einer Two-way ANOVA mit repeated measures (RM) und dem Bonferroni post hoc test (*) statistisch überprüft.

Die statistischen Veränderungen des GSH-Gehaltes der behandelten Zellen gegenüber der EtOH-Kontrolle in Abhängigkeit von der Konzentration wurden mittels einer One-way ANOVA und dem Dunnett's Multiple Comparison Test überprüft.

Für die Überprüfung des GSH-Gehalt der im Challenge Assay verwendeten HT29clone19A Zellen nach 18 Stunden Vorbehandlung mit 0,1 mM BSO wurde der zweiseitig, ungepaarten t-Test gewählt. Ebenso wurde die Glutathion *S*-Transferasetaktivität in LT97 Adenomzellen nach Behandlung mit Butyrat für 24 h mit diesem Test überprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung der Zelllinien

Für die Bearbeitung der Fragestellungen wurde mit humanen Kolonzelllinien gearbeitet. Hierzu gehörten eine „nicht-SV-40-transformierte“ Adenoma-Zelllinie aus dem Humankolon (LT97 [127, 149]) und der differenzierte Subklon von HT29 (Klon19A). Die verwendeten Zelltypen unterscheiden sich in ihrem Transformations- und Differenzierungsgrad und stellen so Modelle für unterschiedliche Krebsstadien dar. Bevor die geplanten Arbeiten an den verschiedenen Kolonzellen aufgenommen wurden, erfolgte eine prinzipielle Charakterisierung der Zelllinien.

3.1.1. Ermittlung der Generationszeiten der Zelllinien

Das hier vorgestellte Modell zur Bestimmung der Generationszeit über die Berechnung der Anzahl der sich entwickelnden Generationen ist ein neues, für bisherige Arbeiten am Lehrstuhl noch nicht eingesetztes Werkzeug zur Charakterisierung der Wachstums- und Verdopplungsdauer von Kulturzellen. Die Anpassung der generierten Daten an das zugrunde liegende (Berechnungs-) Modell wird durch den Determinationskoeffizienten R^2 ausgedrückt, welcher in jeder graphischen Darstellung des exponentiellen Wachstums angegeben wurde. Das Wachstum der Zellen selbst wird als Zunahme der absoluten Zellzahl über den Zeitraum von 0 bis 120 h dargestellt.

LT97 Adenomzellen

Die Kurven in Abb. 8 zeigen das Wachstumsverhalten der Zellen in 3 voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt als absolute Zellzahl (ZZ) über die Zeit. Nach 48 h war eine Zunahme der Zellzahl zu verzeichnen. Die Lagphase der LT97 Zellen beträgt zwischen 24 und 48 Stunden. Nachfolgend stieg die Zellzahl kontinuierlich an. Die Vitalität war von der Kultivierungsdauer unabhängig und wurde durch die zunehmende Konfluenz nicht beeinträchtigt.

Berechnung der Generationenanzahl η der LT97 Zellen zum Zeitpunkt 120 h:

$N = \text{ZZ zum Zeitpunkt } t_{120}$ $N_0 = \text{ZZ zum Zeitpunkt } t_0$

$$\eta = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}$$

$$N = 1,80 \times 10^6 \text{ Zellen} \quad N_0 = 0,15 \times 10^6 \text{ Zellen}$$

$$\eta = \frac{\lg 1,80 \times 10^6 - \lg 0,15 \times 10^6}{\lg 2}$$

$$\eta = 3,6$$

Die Anzahl der Zellteilungen (Generationen η) nach 120 h betrug 3,6. Danach errechnete sich eine Generationszeit der Zellpopulation von 33 h.

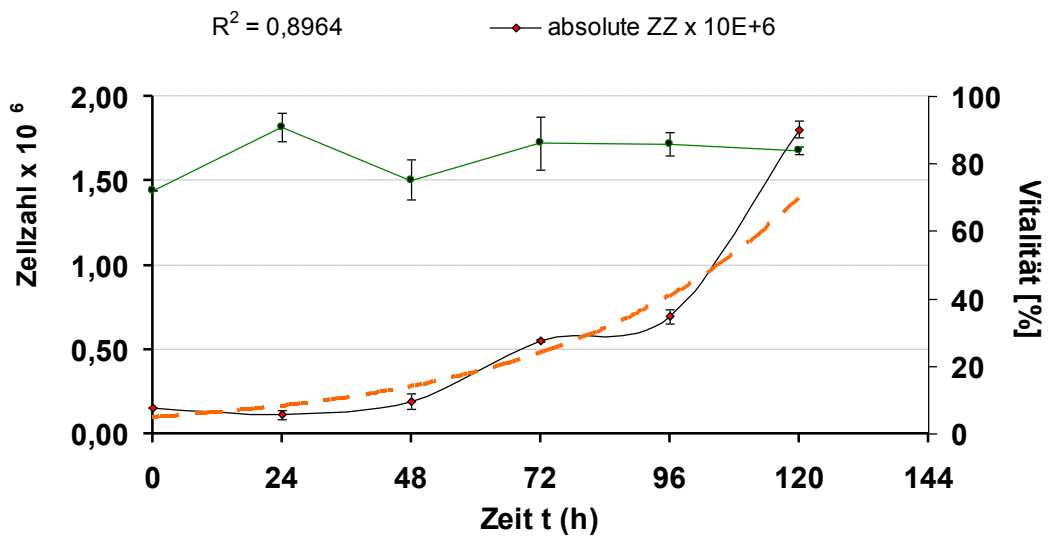


Abbildung 8: Wachstumsverhalten der LT97 Zellen über 120 Stunden in MCDB Medium [n=3]

3.2. Akute Zytotoxizität der Cyclobutanonverbindungen in den verschiedenen Kolonzelltypen

Unter Verwendung des Trypanblau-Ausschlusstests erfolgte eine erste Charakterisierung der *in vitro* Wirkung der Testsubstanzen in Bezug auf ihr Potenzial, die Vitalität der verschiedenen Dickdarmzellen zu modulieren. Die akuten toxischen Effekte der Verbindungen wurden, sofern es sich um Kulturzellen handelte, an subkonfluent gewachsenen Zellen und darüber hinaus an frisch isolierten primären humanen Dickdarmzellen untersucht. Hierbei umfasste die Exposition der Dickdarmzellen gegenüber den Verbindungen einen Zeitraum von 120 min. Der experimentelle Ablauf innerhalb der Versuchsserien mit den verschiedenen Zellmodellen war für alle getesteten Verbindungen analog. Nach der Ernte bzw. Isolierung der Zellen und einem Waschschrift erfolgte die Inkubation von 2×10^6 Zellen im geschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 37°C in RPMI-Medium. In Zeitabständen von 30 min wurden jeweils 20 µl Zellsuspension sofort mit Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgezählt.

3.2.1. HT29clone19A Kolontumorzellen

Die Abb. 9 A bis D zeigen im Überblick das Verhalten der Zellvitalität von HT29clone19A Zellen nach der Inkubation mit den einzelnen 2-Alkylcyclobutanone. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

2dDCB und 2tDCB (Abb. 9A und B) erwiesen sich als nicht zytotoxisch in HT29clone19A Zellen. Weder die Konzentration noch die Zeit beeinflussten die Membranintegrität der Kolontumorzellen. Auch das Lösungsmittel zeigte keine Wirkung auf die Überlebensrate der Zellen.

2tDeCB und 4tDBL (Abb. 9C und D) waren ebenfalls nicht zytotoxisch in HT29clone19A Zellen. Konzentrationsbereiche bis 600 μ M waren mit einer signifikanten Verbesserung der Zellvitalität über die Zeit verbunden.

Insgesamt führte eine Inkubation von HT29clone10A Zellen mit 2-Alkylcyclobutanonen oder dem Lakton weder konzentrations- noch zeitabhängig zu einer Verminderung der Zellvitalität infolge zytotoxischer Effekte.

Die Behandlung der Zellen mit den Kontrollen zeigte insgesamt keine Beeinträchtigung der Membranstabilität. Auch hier kam es wie für die Versuche mit 2tDeCB und 4tDBL zu einer Erhöhung der Vitalitätswerte.

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse für die Kontrollen sind im Anhang zu finden. Da ausgenommen im Versuch 1 mit 2dDCB jeweils 2 Verbindungen (2dDCB und 2tDCB; 2tDeCB und 4tDBL) parallel in einem Ansatz getestet wurden, war es ausreichend, dass die Kontrollen für das Medium (UK), das Lösungsmittel (0) und die Positivkontrolle (PK II) nur einmal mitgeführt wurden.

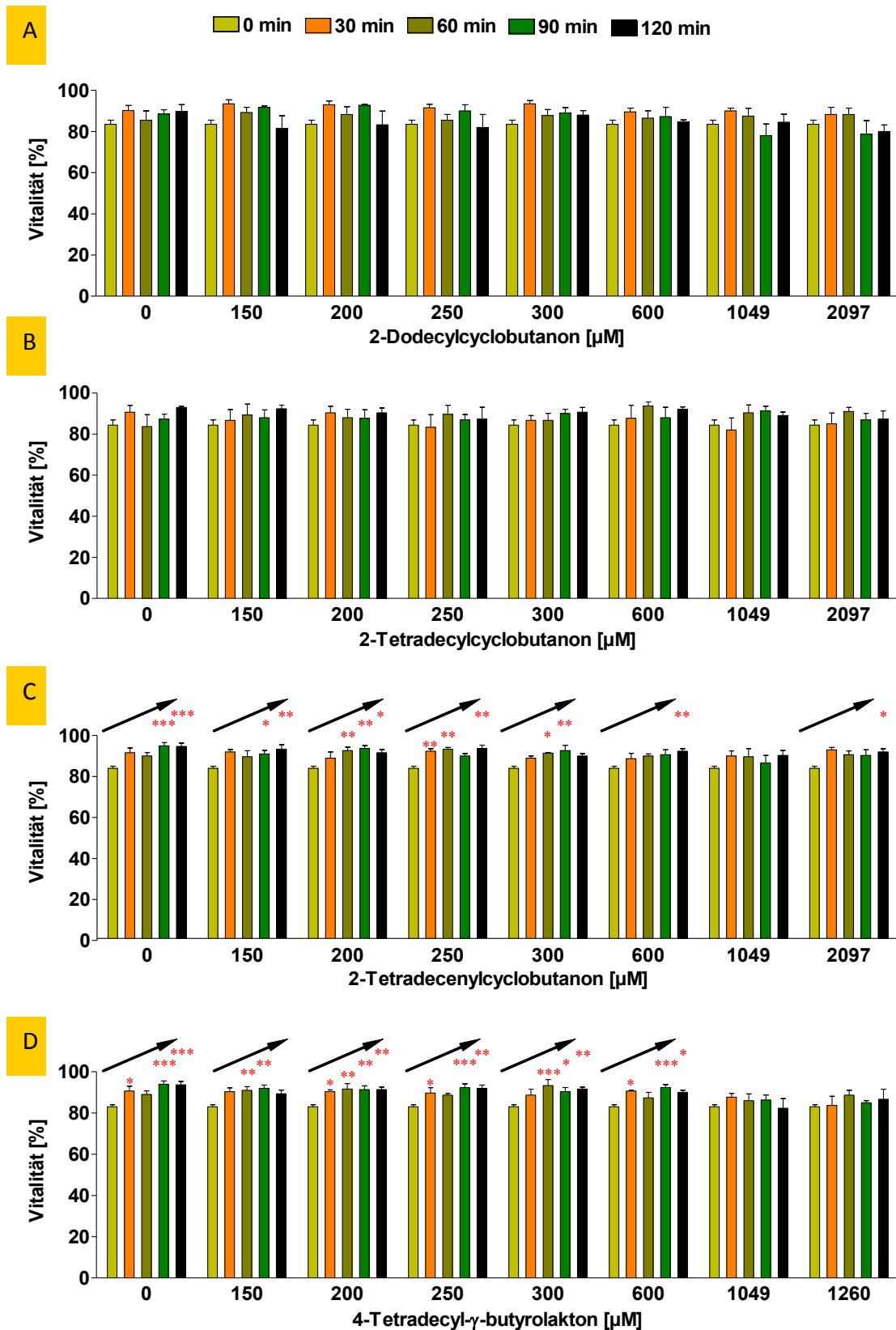


Abbildung 9: Einfluss der Cyclobutanonverbindungen auf die Vitalität von HT29clone19A Zellen im Vergleich zur Vitalität nach der Gewinnung
Die statistisch signifikanten Veränderungen der Vitalität gegenüber der Ausgangsvitalität (0 min) in Abhängigkeit von der Zeit entsprechen * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2.2. LT97 Adenomzellen

Die Versuche in der Serie mit den LT97 Adenomzellen wurden ab dem Waschschrift nach der Zellaufarbeitung analog dem Ablauf in der HT29clone19-Serie durchgeführt. Zuvor wurden die zu Aggregatbildung neigenden LT97 Zellen nach der Ernte einer 6-minütigen Behandlung mit Trypsin bei 37°C im Wasserbad unterzogen um diese besser vereinzeln zu können. Dadurch war eine genaue Einstellung der Zelldichte von 2×10^6 Zellen je Milliliter möglich. Die Kontrollen (Medium (UK), Ethanol (0), PK II(150 µM 4-HNE), wurden um eine geringer konzentrierte Positivkontrolle von 100 µM 4-HNE (PK I) erweitert. Die Ergebnisse sind in einer Übersicht (Abb. 10A bis D) graphisch dargestellt.

In LT97 Adenomzellen wirkte 2dDCB in den höchsten getesteten Konzentrationen (1049 und 2097 µM) bereits nach 60-minütiger Inkubation signifikant zytotoxisch (Abb. 10A). Dabei verringerte sich die Überlebensrate der Zellen von $86,3 \pm 1,8$ % Ausgangsvitalität auf $65,7 \pm 8,2$ bzw. $64,3 \pm 7,4$ %. Über die Zeit nahm die Absterberate der Zellen, welche mit 2dDCB inkubiert wurden, konzentrationsabhängig zu. Das Lösungsmittel hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Zur Berechnung der effektiven Wirkkonzentration EC_{50} von 2dDCB zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die absoluten Werte auf die Daten der mit Ethanol behandelten Zellen normalisiert (Anhang S. 123). Die über Interpolation ermittelten EC_{50} Werte liegen nach 90 min bei 589 µM 2dDCB und nach 120 min bei 221 µM.

2tDCB wirkte in LT97 Adenomzellen nach 90 min ab einer Konzentration von 1049 µM signifikant zytotoxisch ($79,0 \pm 2,1$ und $79,7 \pm 5,8$ %) (Abb. 10B). Insgesamt waren geringe zeitabhängigen, aber keine eindeutigen konzentrationsabhängigen Effekte nachweisbar. Nach 120 min Inkubation mit 2097 µM war die Vitalität der Zellen signifikant auf $66,3 \pm 8,1$ % verringert. Ein ähnlich starker Effekt war bereits nach 150 µM und gleicher Inkubationsdauer sichtbar. Hier war die Vitalität ebenfalls signifikant von $93,0 \pm 1,5$ % auf $71,7 \pm 8,8$ % verringert. Die Bestimmung einer EC_{50} war aufgrund der weniger ausgeprägten zytotoxischen Wirkungen nicht möglich.

In den Adenomzellen zeigten sich nach 90-minütiger Inkubation mit 2tDeCB in den höchsten getesteten Konzentrationen (1049 und 2097 µM) zytotoxische Effekte (Abb. 10C). Dabei verringerten sich die Überlebensraten der Zellen von $82,7 \pm 1,2$ % Ausgangsvitalität auf $49,7 \pm 20,7$ und auf $49,3 \pm 19,2$ %. Die höchste zytotoxische Wirkung wurde nach 120 min bei einer Konzentration von 2097 µM beobachtet. Hier lag die Vitalität nur noch bei $31,3 \pm 13,7$ %. Trotz der hohen Abweichungen innerhalb der Versuchserie ergab die Berechnung für 2tDeCB eine effektive Wirkkonzentration (EC_{50}) von 409 µM nach 120 min. Das Lösungsmittel hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Im gesamten Konzentrationsbereich von 4tDBL

konnten in LT97 Adenomzellen nach 90 min signifikant zytotoxische Effekte nachgewiesen werden (Abb. 10D). Diese Effekte nahmen in Abhängigkeit von der Zeit der Inkubation zu. Ein eindeutiger Konzentrations-Wirkungszusammenhang konnte nicht nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle von 150 μ M 4tDBL führte hauptsächlich in Abhängigkeit von der Zeit zu irreversiblen Membranschäden und somit zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität der LT97 Adenomzellen. Jedoch induzierte eine Konzentration von 100 μ M 4-HNE nur in einem Teil der Experimente Zytotoxizität. Für das Lösungsmittel waren keine zytotoxischen Wirkungen nachweisbar.

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse für die Kontrollen sind im Anhang zu finden.

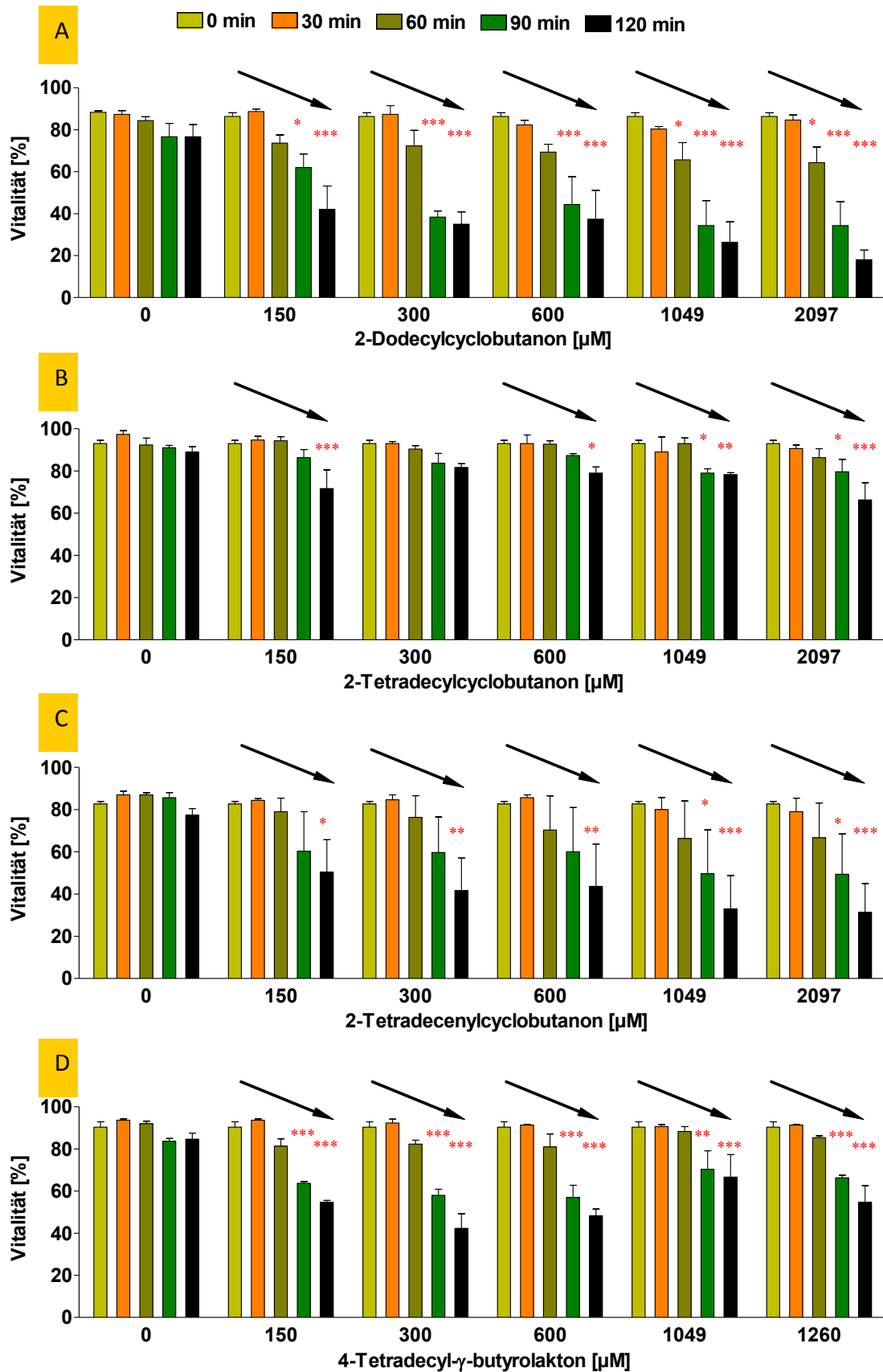


Abbildung 10: Einfluss der Cyclobutanonverbindungen auf die Vitalität von LT97 Zellen im Vergleich zur Vitalität nach der Gewinnung
Die statistisch signifikanten Veränderungen der Vitalität gegenüber der Ausgangsvitalität (0 min) in Abhängigkeit von der Zeit entsprechen * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2.3. Primäre Kolonzellen

Mit den aus dem Epithel der Spendergewebe frisch isolierten primären Kolonzellen wurde analog der vorangegangenen Versuchsserien mit HT29clome19A und LT97 Zellen verfahren und eine Zellsuspension der Dichte $2 \times 10^6/\text{ml}$ Zellen verwendet. Die Ergebnisse sind in einer Übersicht (Abb. 11A bis D) graphisch dargestellt.

Das Gewebe für die Untersuchungen des 2dDCB stammte von insgesamt 6 Donoren. Die Spender (5 männlich, 1 weiblich) hatten ein durchschnittliches Alter von $55,8 \pm 15,6$ Jahren.

2dDCB war in primären frisch isolierten humanen Kolonzellen stark zytotoxisch (Abb. 11A). Eine signifikante Zellschädigung trat innerhalb von 30 min bei Konzentrationen $\geq 300 \mu\text{M}$ auf. Dabei verringerte sich die Vitalität der Zellen von $87,7 \pm 3,1 \%$ auf $66,8 \pm 5,7 \%$. Im Gegensatz zu den übrigen Versuchsreihen verursachte in dieser Versuchsserie auch das Lösungsmittel Ethanol (4%) nach 90 und 120 min zytotoxische Effekte. Die um den Ethanol-Effekt bereinigten Daten (Anhang, S. 132) zeigen, dass nicht nur die Zeit, sondern auch die Konzentration von 2DCB einen signifikanten Effekt auf die Vitalität der Zellen hat. So ergaben sich für 2dDCB in primären Kolonzellen effektive Wirkkonzentrationen von $157 \mu\text{M}$ nach 90 min und $93 \mu\text{M}$ nach 120 min.

Zur Untersuchung von 2tDCB wurden Zellen aus 4 voneinander unabhängigen Gewebestücken verschiedener Spender gewonnen. Das durchschnittliche Alter der Spender (1 männlich, 3 weiblich) betrug $65,8 \pm 17$ Jahre.

In frisch isolierten primären humanen Dickdarmzellen wirkte 2tDCB zeitabhängig im Vergleich zu Ethanol als Lösungsmittelkontrolle nach 60, 90 und 120 min signifikant zytotoxisch (Abb. 11B). Auch das Lösungsmittel verringerte nach 90 und 120 min signifikant die Zellvitalität. Die Gegenüberstellung der ermittelten absoluten Zellzahlen in einer repeated measures (RM) Two-way ANOVA zeigte für eine Behandlung der Zellen mit $2097 \mu\text{M}$ nach 60 min und den Konzentrationen 150, 300, 1049 und $2097 \mu\text{M}$ nach 90 min sowie für alle getesteten Konzentrationen nach 120 min signifikant verringerte Überlebensraten.

Zellen aus 3 voneinander unabhängigen Gewebestücken verschiedener Spender (2 männlich, 1 weiblich) wurden mit 2tDeCB inkubiert. Das durchschnittliche Alter der Spender betrug $60,3 \pm 14,2$ Jahre.

Die primären Kolonzellen reagierten zeit- und konzentrationsabhängig auf die Exposition gegenüber 2tDeCB mit einer Abnahme der Vitalität (Abb. 11C). Nach 60 min wirkte die Behandlung mit $2097 \mu\text{M}$ signifikant zytotoxisch ($X \pm X \%$), nach 90 min die Inkubation mit $1049 \mu\text{M}$ ($62,7 \pm 9,8 \%$). Die höchste Konzentration von $2097 \mu\text{M}$ hatte den stärksten

zytotoxischen Effekt. Die Vitalität betrug hier nach 120 min nur noch $39,0 \pm 6,4$ % bei einer Ausgangsvitalität von $83,7 \pm 1,2$ %. Die EC_{50} lag nach 120 min bei $213 \mu\text{M}$ 2tDeCB.

Aus 3 voneinander unabhängigen Gewebestücken verschiedener, ausschließlich männlicher, Spender wurden Zellen für die Untersuchung von 4tDBL gewonnen. Das durchschnittliche Alter der Spender betrug $57 \pm 8,5$ Jahre.

In den ersten 60 min der Behandlungszeit mit 4tDBL zeigten die Zellen keine mikroskopisch sichtbaren Membranveränderungen (Abb. 11D). Nach 90 min nahm die Vitalität unabhängig von den getesteten Konzentrationen signifikant ab. Dieser Effekt war verstärkt auch nach 120 min Behandlung der Zellen zu beobachten. EtOH hatte dabei keine zytotoxischen Effekte gezeigt, so dass eine reine Substanz-abhängige Wirkung in den Zellen zu sehen war.

Eine EC_{50} konnte aufgrund der konzentrationsunabhängigen Wirkung des 4tDBL nicht berechnet werden, obwohl bereits nach 90 min bei einer Konzentration von $300 \mu\text{M}$ die Vitalitäten auf ca. 50 % vermindert waren.

Wie in der LT97-Versuchserie diente 4-HNE in den Konzentrationen 100 und $150 \mu\text{M}$ (PK I, PK II) als Positivkontrolle in primären humanen Kolonepithelzellen. Die Daten für die Kontrollen der einzelnen Versuchsreihen mit den 2ACB und dem Lakton sind im Anhang (Anhang S. 131) zusammengefasst.

Die Kontrolldaten zeigen eindeutig die Versuchsreihen, in denen das Lösungsmittel einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte, wodurch es zu einer Maskierung der reinen substanz-induzierten Effekte kam. Dies wurde jedoch bei der Ergebnisbeschreibung beachtet, indem die EC_{50} Werte ebenfalls nur die auf EtOH normalisierten Werte widerspiegeln. Darüber hinaus verdeutlichen die Positivkontrollen große interindividuelle Unterschiede in der Sensitivität der Spenderzellen. In den meisten Fällen wirkte bereits PK I ($100 \mu\text{M}$ HNE) signifikant zytotoxisch. Im Fall der 2tDeCB-Versuchsreihe war dies nicht zu beobachten. Die Vitalitäten der Zellen waren hier größer als 70 %.

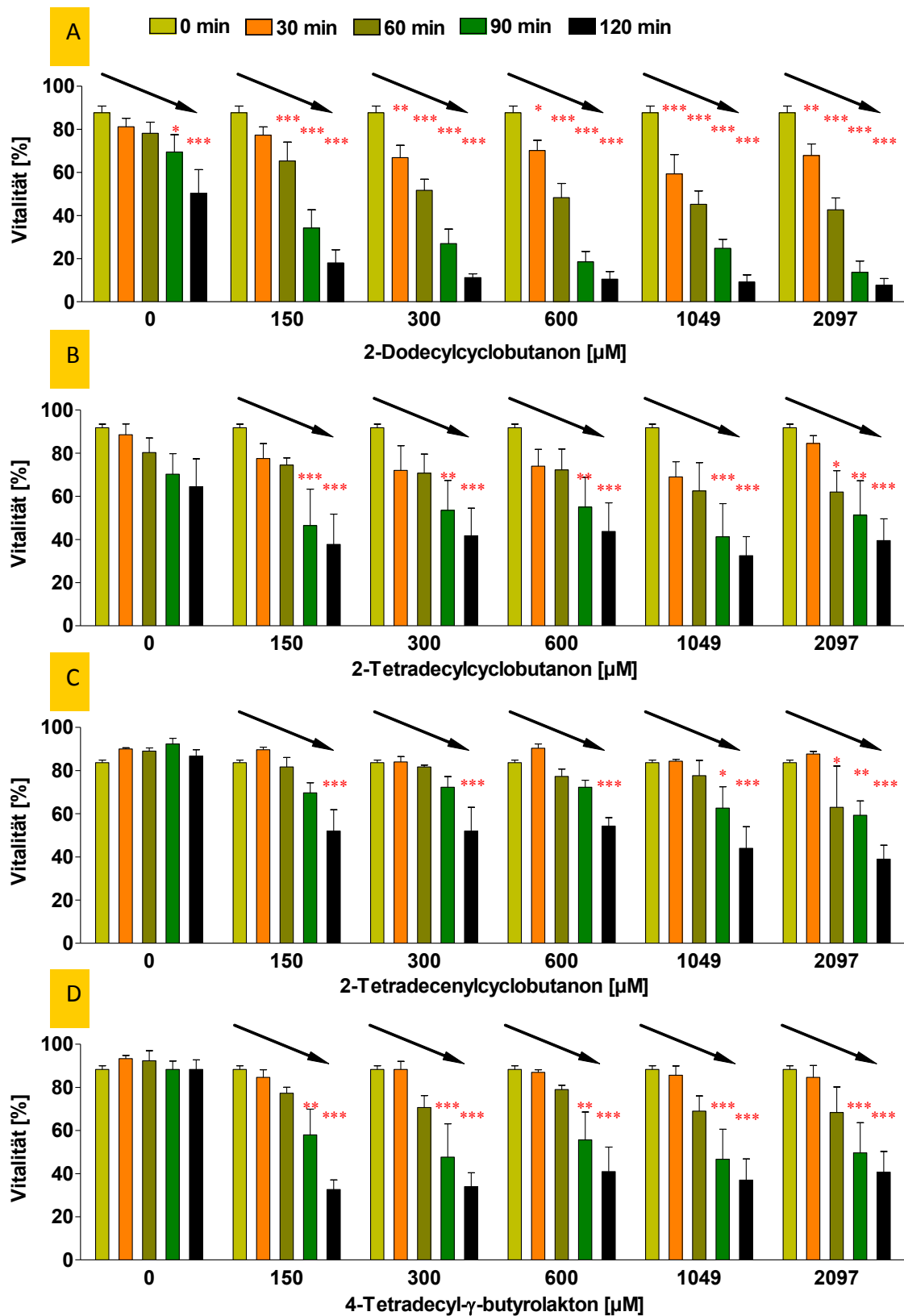


Abbildung 11: Einfluss der Cyclobutanonverbindungen auf die Vitalität von Primärzellen im Vergleich zur Vitalität nach der Aufarbeitung
 Die statistisch signifikanten Veränderungen der Vitalität gegenüber der Ausgangsvitalität (0 min) in Abhängigkeit von der Zeit entsprechen * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. Nachweis genotoxischer Effekte der Cyclobutanonverbindungen mit dem alkalischen Comet Assay

Ziel der Comet Assay-Versuche war es, die DNA-schädigende Wirkung der Cyclobutanone in humanen Kolonzellen zu untersuchen. Dazu wurden Zellen der HT29clone19A Kolonkarzinomzelllinie, Zellen der LT97 Kolonadenomzelllinie und primäre Kolonepithelzellen verwendet. Diese Zellen entsprechen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kolonkarzinogenese und ermöglichen die Untersuchung der spezifischen Sensitivität dieser (Nicht-) Tumorstadien.

Um die Höhe der DNA-Schädigung durch die 2ACB mit dem von 4-HNE vergleichen zu können, wurde 4-HNE in 2 Konzentrationen, 100 und 150 μM , als Positivkontrollsubstanz mitgeführt (HT29clone19A-Versuchsserien nur 150 μM). Die Vitalität der Zellen wurde vor Versuchsbeginn und nach der jeweiligen Inkubation mit den Testsubstanzen bestimmt. Die verwendeten Zellen sollten bevor sie in den Comet Assay eingebracht werden eine Vitalität $\geq 70\%$ aufweisen, wodurch sichergestellt wird, dass die mittels Comet Assay gemessenen DNA-Schäden auf genotoxischen und nicht auf zytotoxischen Effekten beruhen [140].

3.3.1. HT29clone19A Kolonkarzinomzellen

Die ersten Versuchsserien mit 2ACB in HT29clone19A Zellen dienten der Absicherung und Optimierung der Versuchsbedingungen mit Ethanol (*EtOH*) als Lösungsmittel für die Testsubstanzen. Hierfür wurde 2dDCB verwendet. Die Ergebnisse der versuchsoptimierenden Ansätze, woraus sich die folgenden Standardversuchsbedingungen ergaben, werden im Anhang vorgestellt (Anhang S. 132).

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Testsubstanzen wie unter 2.4. beschrieben in Lösung gebracht und verschiedene Stammlösungen hergestellt. Da die Induktion von DNA-Schäden durch das Lösungsmittel vernachlässigbar gering war, wurden die Stammlösungen in Kulturmedium so verdünnt, dass ein EtOH-Anteil von 4% nicht überschritten wurde. Als Positivkontrolle wurde eine Konzentration von 150 μM 4-HNE eingesetzt, welche folgend als PK II bezeichnet wird.

Die Abb. 12 bis 15 geben einen Überblick über die mit dem Comet Assay (30 min) erstellten Wirkungsprofile der Einzelsubstanzen 2dDCB, 2tDCB, 2tDeCB und 4tDBL in den HT29clone19A Zellen sowie über die Vitalitäten der in das Testsystem eingebrachten Zellen (Abbildungen 12 - 15 Teil A). Wenn nicht anders beschrieben, wurden die mittleren Werte aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen zusammengefasst.

2-Dodecylcyclobutanon

Im Vergleich zur EtOH-Kontrolle (0) induzierte nur die maximale Konzentration 2dDCB signifikante DNA-Schäden in HT29clone19A Zellen ($6,96 \pm 0,86\%$; Abb. 12B). Insgesamt stieg die Genotoxizität von 2dDCB mit zunehmender Konzentration nur gering an. Die 4-HNE-Positivkontrolle war in HT29clone19A Zellen signifikant genotoxisch ($9,02 \pm 0,83\%$). Die Vitalität der Zellen wurde weder durch das Lösungsmittel EtOH, noch durch die Testsubstanzen 2dDCB und 4-HNE signifikant beeinträchtigt (Abb. 12A).

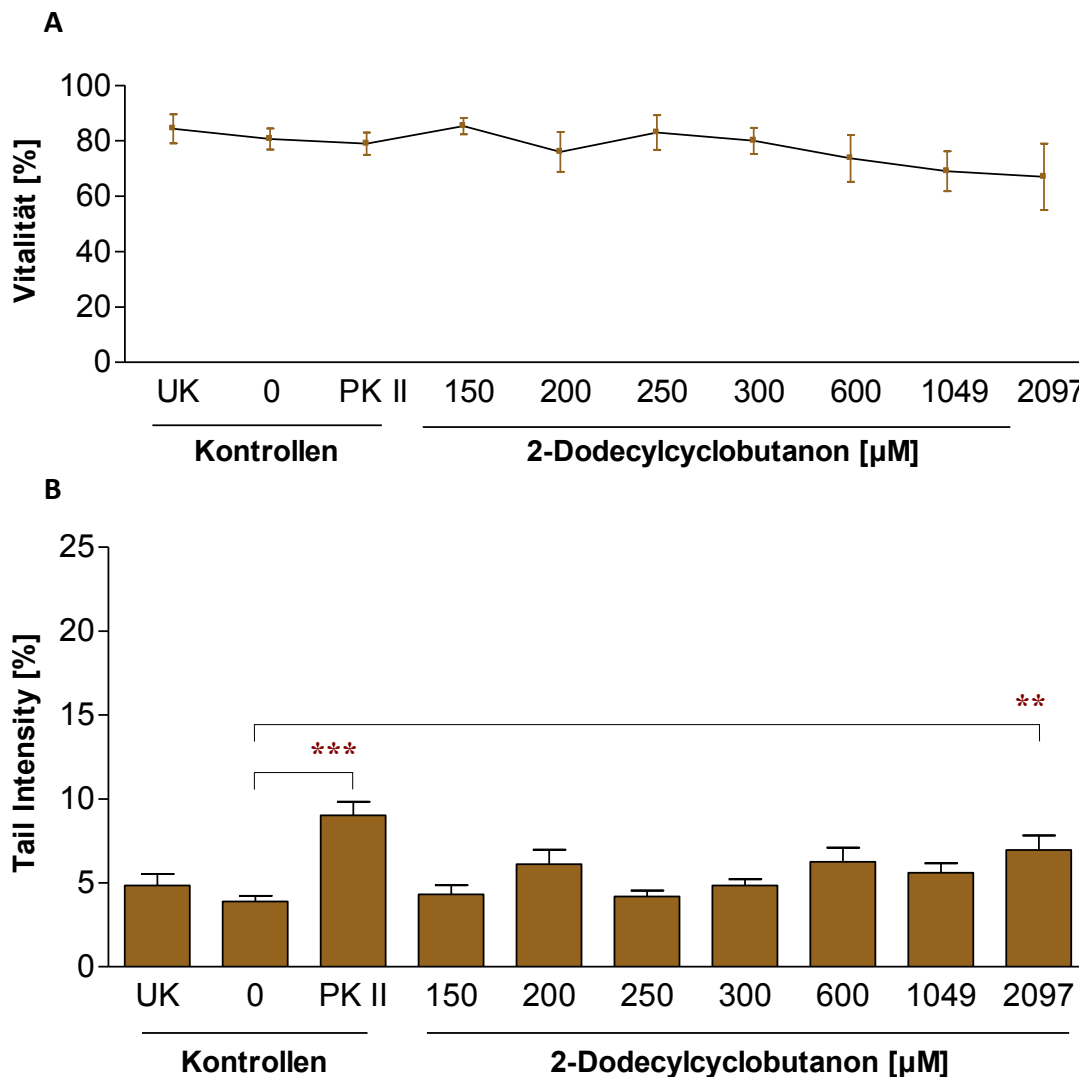


Abbildung 12: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon
[**p<0.01, ***p<0.001]

2-Tetradecylcyclobutanon

In HT29clone19A Zellen induzierten im Vergleich zur EtOH-Kontrolle (0) nur 300 μM 2tDCB einen signifikanten DNA-Schaden ($7,52 \pm 0,98\%$) (Abb. 13). Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Tail Intensity war nicht zu beobachten. Die 4-HNE-Positivkontrolle

induzierte in dieser Versuchsreihe signifikante DNA-Schäden ($9,74 \pm 0,66\%$; Abb. 13B). Die Vitalität der Zellen wurde weder durch das Lösungsmittel EtOH, noch durch die Testsubstanzen 2tDCB und 4-HNE signifikant beeinträchtigt (Abb. 13A).

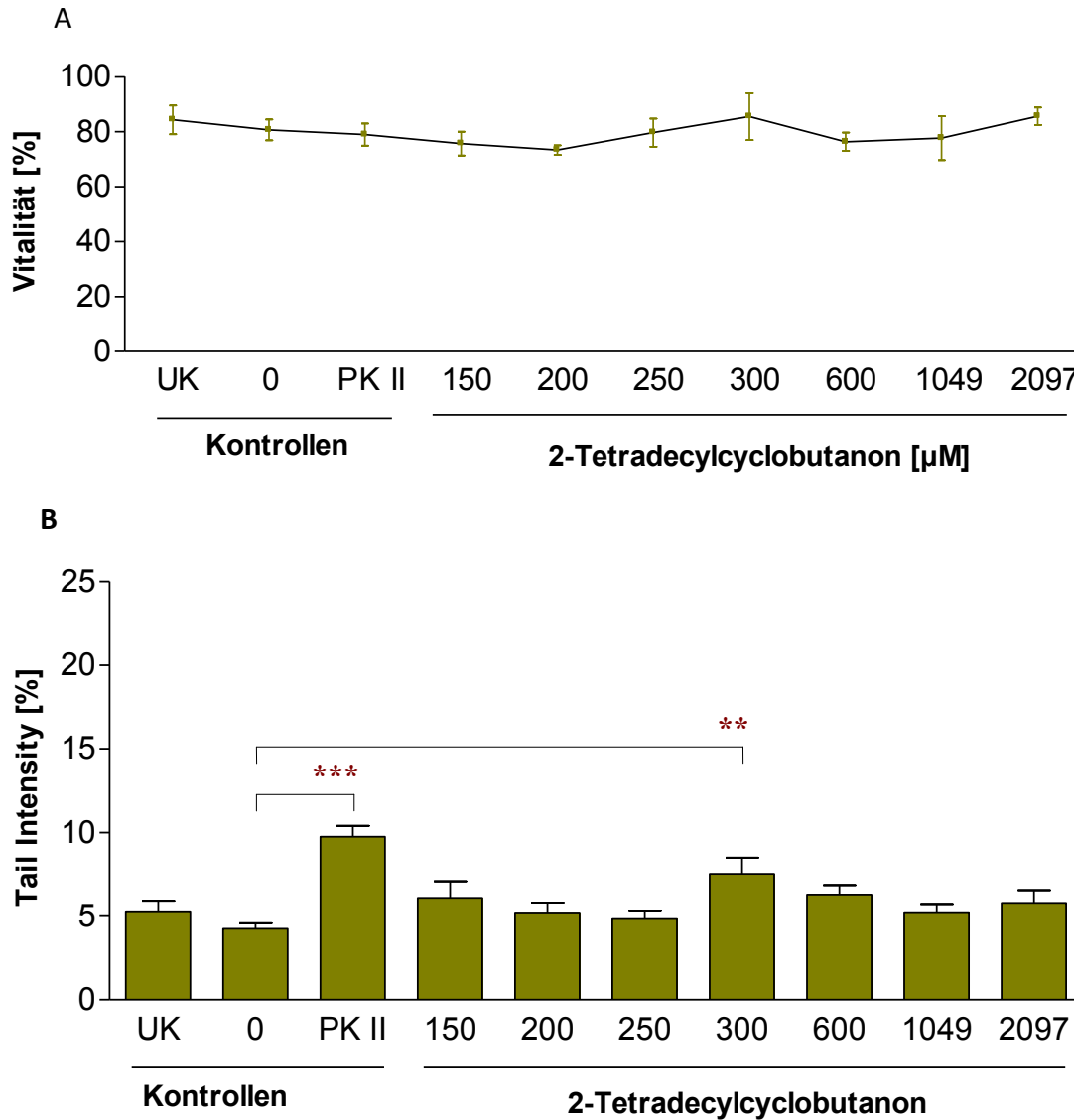


Abbildung 13: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon
[**p<0.01, ***p<0.001]

2-Tetradecylcyclobutanone

In HT29clone19A Zellen erwies sich 2tDeCB als nicht genotoxisch (Abb. 14B). Die 4-HNE-Positivkontrolle hingegen induzierte einen signifikanten DNA-Schaden in HT29clone19A Zellen ($7,41 \pm 0,86\%$). Die Vitalität der Zellen blieb nach Behandlung mit den Testsubstanzen unverändert (Abb. 14A).

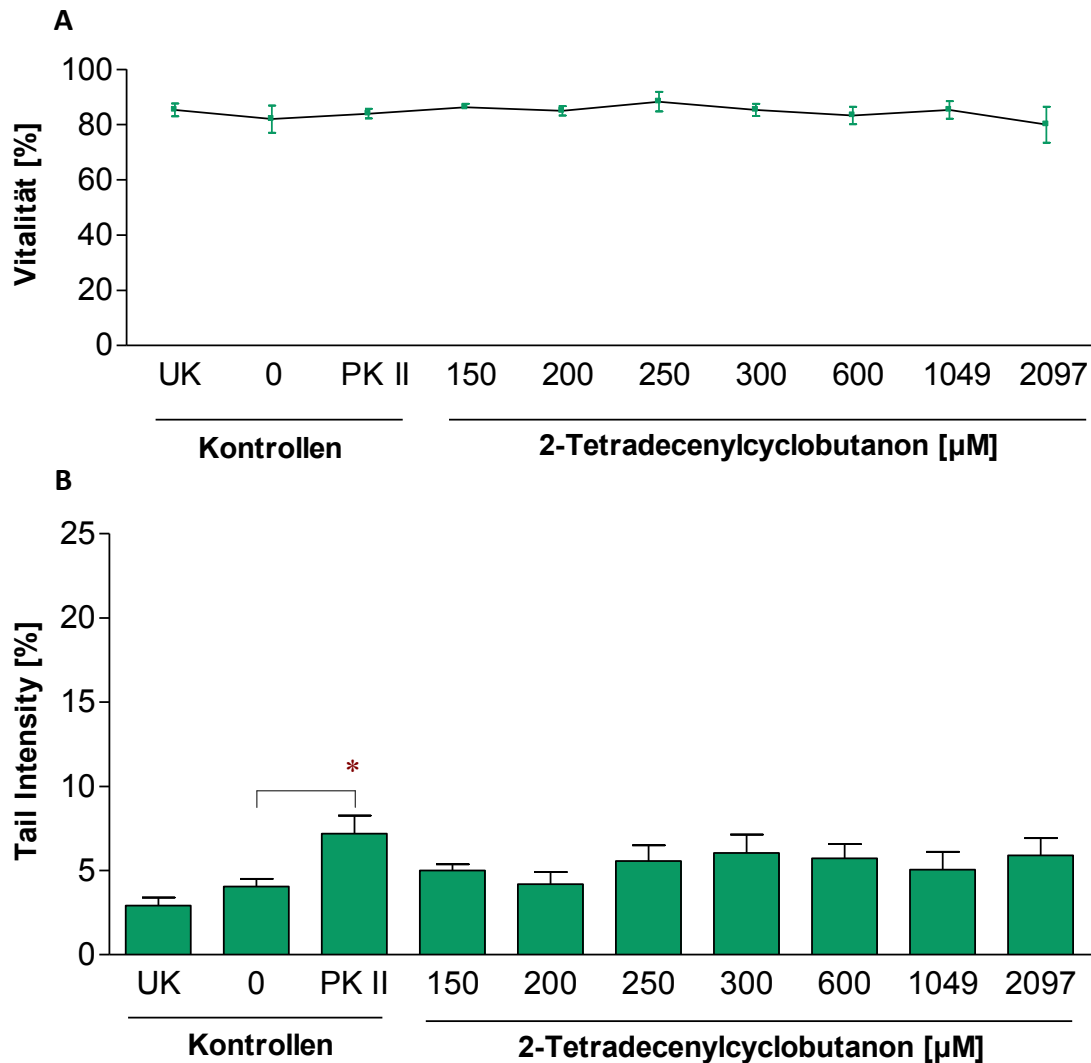


Abbildung 14: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon
[*p<0.05]

4-Tetradecyl- γ -butyrolakton

Auch das Oxidationsprodukt von 2tDCB, 4tDBL, erwies sich gegenüber der EtOH-Kontrolle ($4,45 \pm 0,55\%$) unter den gegebenen Bedingungen als nicht genotoxisch in HT29clone19A Zellen (Abb. 15B). Die 4-HNE-Positivkontrolle induzierte wiederum signifikante DNA-Schäden ($10,68 \pm 1,82\%$). Darüber hinaus hatte auch EtOH einen signifikanten Einfluss auf die Integrität der DNA. Die Vitalität der Zellen wurde weder durch das Lösungsmittel EtOH, noch durch die Testsubstanzen 4tDBL und 4-HNE signifikant beeinträchtigt (Abb. 15A).

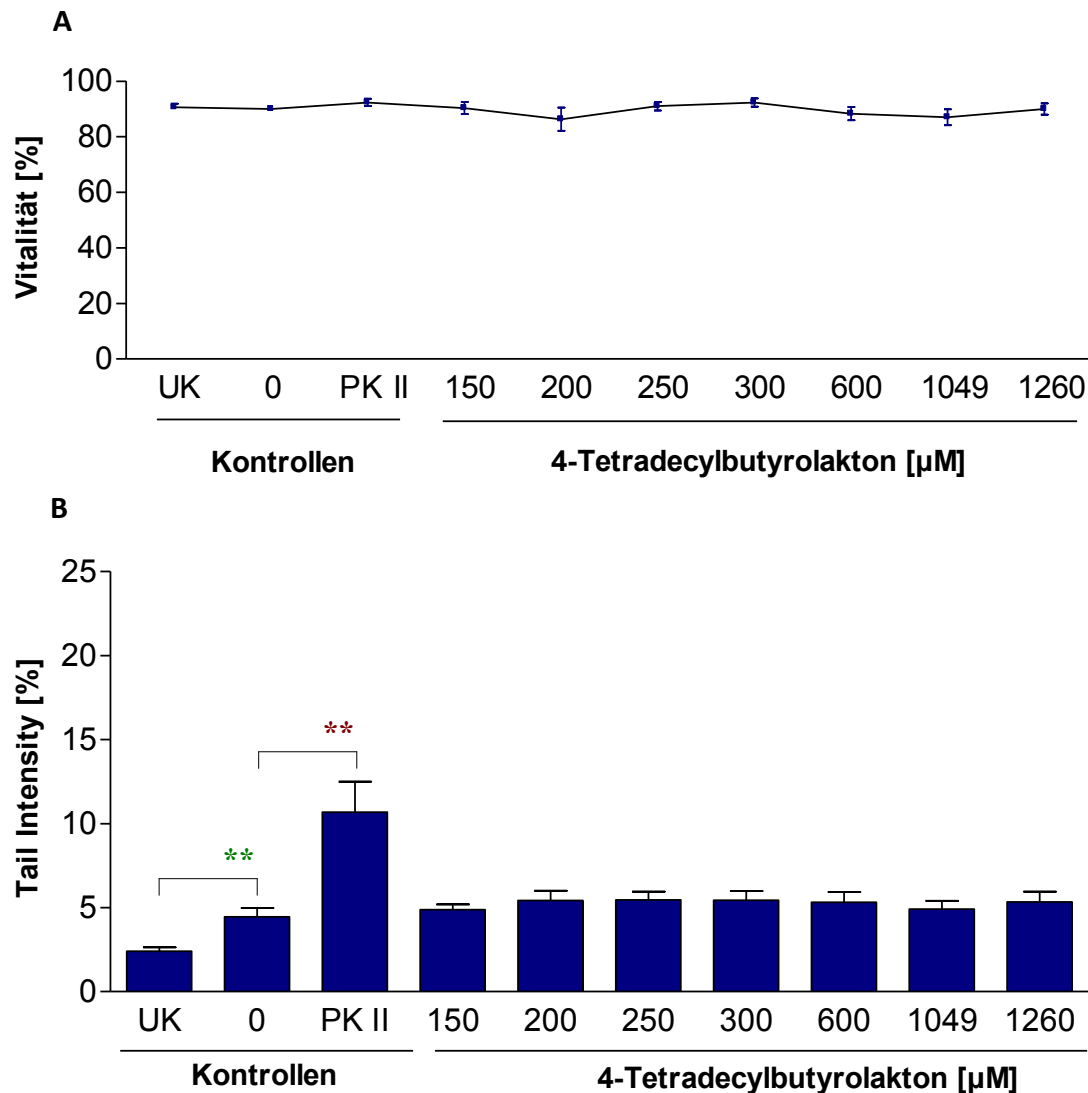


Abbildung 15: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): HT29clone19A Zellen nach 30 min im Comet Assay mit 4-Tetradecyl-γ-butyrolakton [**p<0.01]

3.3.2. LT97 Adenomzellen

In der Kolonkrebszelllinie HT29clone19A waren nur geringe genotoxische Effekte der 2ACB zu beobachten. 4-HNE hingegen war deutlich genotoxisch. In den LT97 Zellen wurden aufgrund bereits vorliegender Ergebnisse höhere DNA-Schäden durch 4-HNE erwartet. Daher wurden LT97 Zellen mit einer zusätzlichen, geringeren 4-HNE-Konzentration (100 μM) behandelt, welche als zweite Positivkontrolle (PK I) in das Testsystem eingebracht wurde. Um zeitabhängige Veränderungen der DNA-Schäden zu beobachten, wurden die Zellen zusätzlich zu einer 30 minütigen Inkubationsdauer 60 min lang mit den Testsubstanzen inkubiert. Zur genauen Untersuchung der Dosis-Wirkungszusammenhänge bezüglich der genotoxischen Effekte in LT97 Adenomzellen wurden sowohl die absolut gemessenen DNA-Schäden als auch die relativen Werte normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle ausgewertet.

2-Dodecylcyclobutanon

Die Abb. 16B zeigt, dass 2dDCB nach 30 min im Comet Assay ab einer Konzentration von 300 μM signifikant DNA-Schäden in LT97 Adenomzellen ($12,76 \pm 1,18\%$ TI) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle EtOH (0) induzierte. Die maximale DNA-Schädigung nach 30 min wurde durch 1049 μM 2dDCB ($17,41 \pm 0,92\%$ TI) induziert.

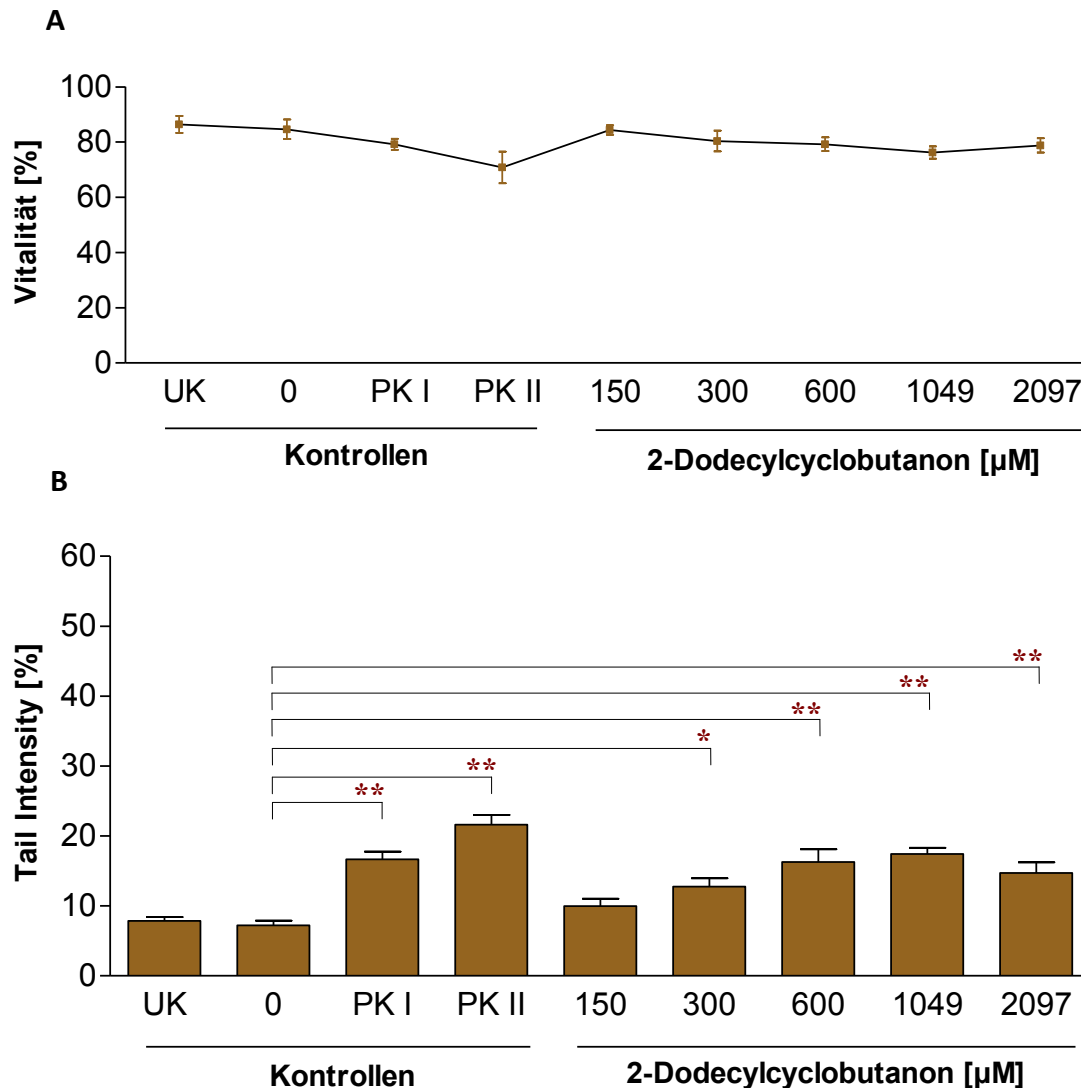


Abbildung 16: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon [n=5]
[*p<0.05, **p<0.01]

Für die 60 min Behandlung der Zellen (Abb.17) ergaben beide Auswertungsansätze, dass ab einer Konzentration von 600 μM die Schäden Signifikanz erreichten, jedoch nicht weiter zunahm. Sowohl das Vitalitätsniveau als auch die gemessenen Tail Intensities blieben unverändert.

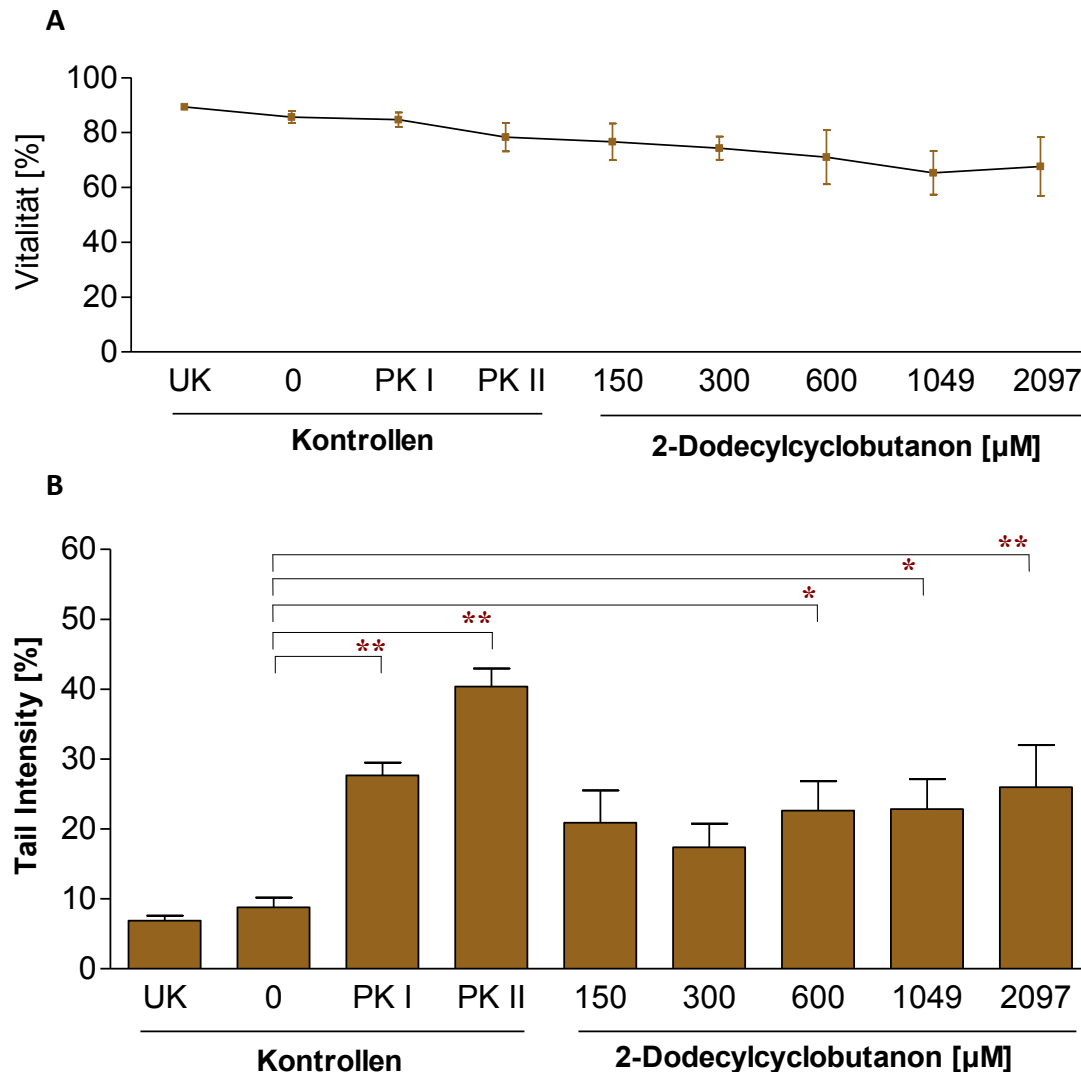


Abbildung 17: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon [n=3]
 [*p<0.05, **p<0.01]

Nach 60 min trat durch die Testsubstanz 2dDCB eine signifikante Verminderung der Zellvitalität auf (60 min, $\geq 600 \mu\text{M}$). So wurde für die nicht zytotoxische Konzentration von $150 \mu\text{M}$ im Vergleich zur 30 min Inkubation eine signifikante Zunahme der DNA-Schäden nach 60 min um den Faktor 2,6 von $9,95 \pm 1,09$ auf $25,98 \pm 3,29$ % TI bestimmt. $300 \mu\text{M}$ hingegen führten nicht zu einem signifikanten Anstieg der Tail Intensity nach 60 min.

Die PK II induzierte starke genotoxische Effekte, welche zeitabhängig um den Faktor 1,7 zunahmen ($21,63 \pm 1,40$ % TI nach 30 min und $37,33 \pm 2,28$ % TI nach 60 min). Dabei waren die 4-HNE-Positivkontrollen sowohl nach 30 als auch nach 60 min in LT97 Zellen signifikant genotoxisch ohne einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen zu haben. Durch das Lösungsmittel EtOH wurden keine Schäden an den Zellmembranen und der DNA induziert.

2-Tetradecylcyclobutanon

Durch 2tDCB wurden in LT97 nach 30 und nach 60 min DNA-Schäden induziert. Nach 30 min ergab die Behandlung mit 1049 μM eine erste signifikante Schädigung ($19,54 \pm 2,39\% \text{TI}$; Abb. 18B).

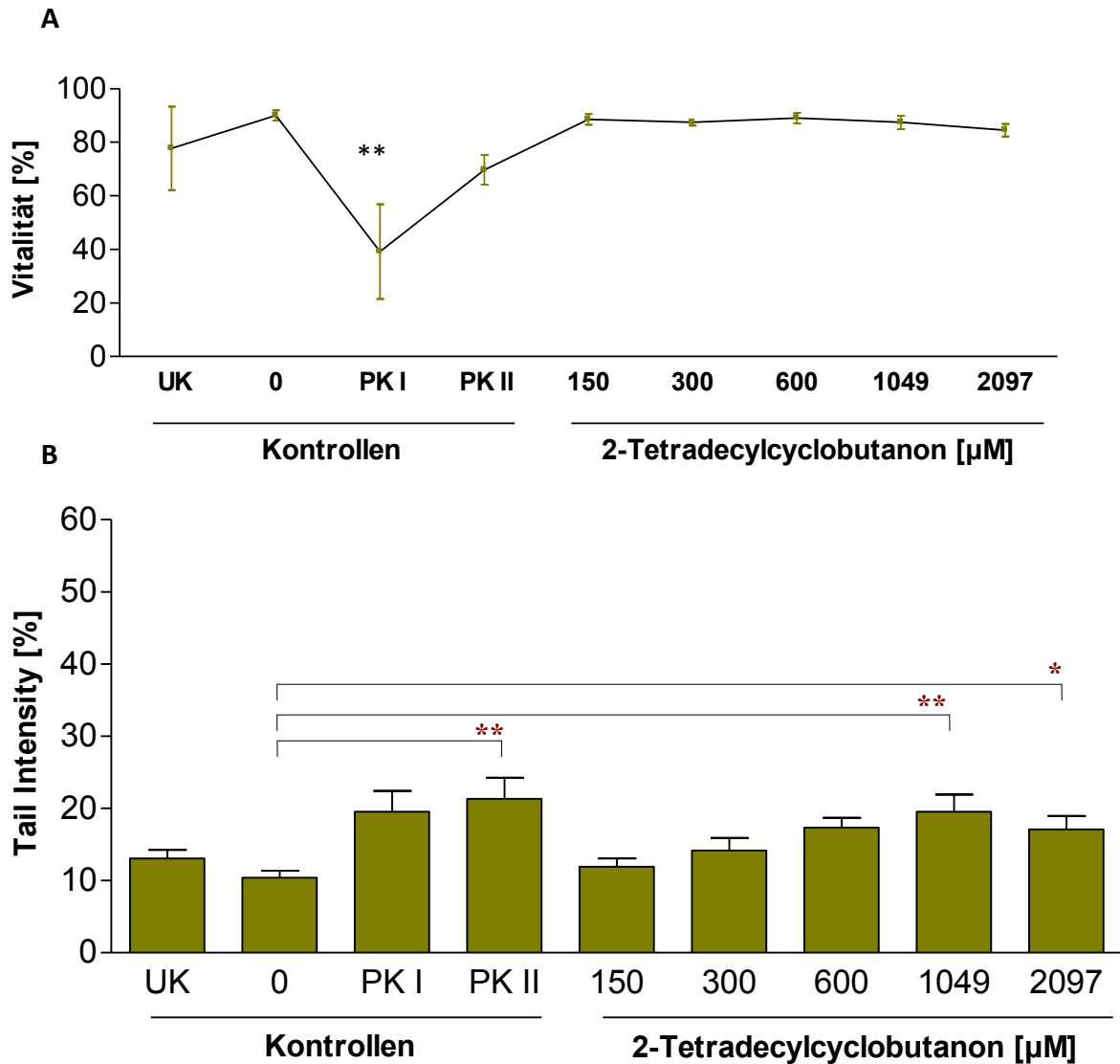


Abbildung 18: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=6]
[p<0.05, **p<0.01]

Die Abbildung 19 zeigt nach 60 min nur nach 1049 μM 2tDCB eine signifikante DNA-Schädigung ($21,78 \pm 3,27\% \text{TI}$). Im Vergleich zur 30-minütigen Behandlung erhöhten sich die DNA-Schäden nicht nach einer auf 60 min verlängerter Inkubationszeit.

Die Positivkontrolle zeigte über die Zeit einen Anstieg der Schäden um den Faktor 2 von $13,74 \pm 3,57$ auf $27,35 \pm 3,03\% \text{TI}$ (Abb. 18B und 19B).

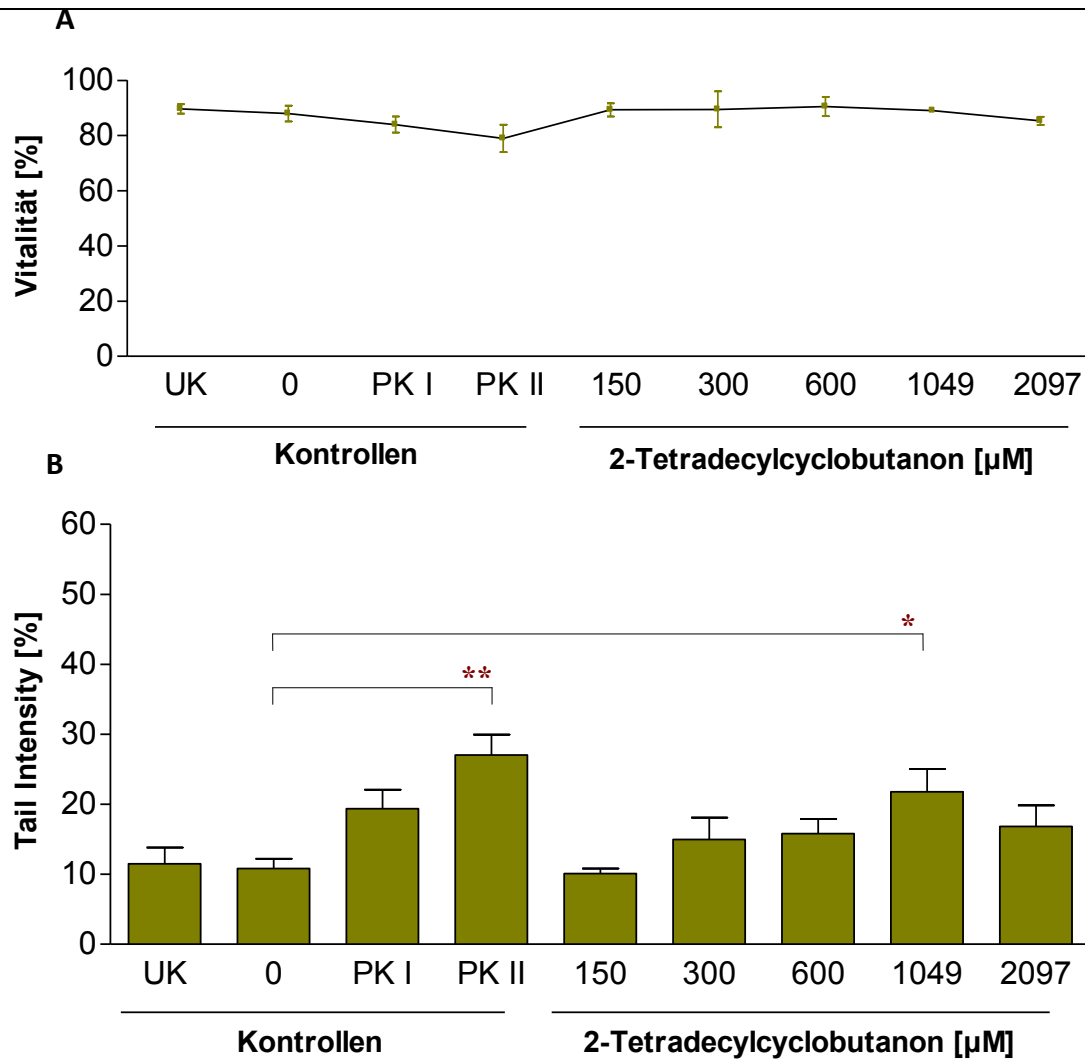


Abbildung 19: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=3]
[*p<0.05, **p<0.01]

2-Tetradecylcyclobutanon

Sowohl eine 30- als auch eine 60-minütige Inkubation mit 2tDeCB induzierten in LT97 Adenomzellen signifikante DNA-Schäden, welche nur tendenziell dosisabhängig waren.

Nach 30 min war 2tDeCB in allen getesteten Konzentrationen genotoxisch (Abb. 20B).

Im Gegensatz dazu induzierten nach 60 min nur 300 und 2097 μM 2tDeCB signifikante DNA-Schäden (Abb. 21B).

Während das Lösungsmittel weder in der 30-, noch in der 60-minütigen Inkubation die Vitalität der Zellen beeinflusste, zeigte es jedoch im Comet Assay nach 60 min einen signifikanten Effekt auf die Integrität der DNA (Abb. 21).

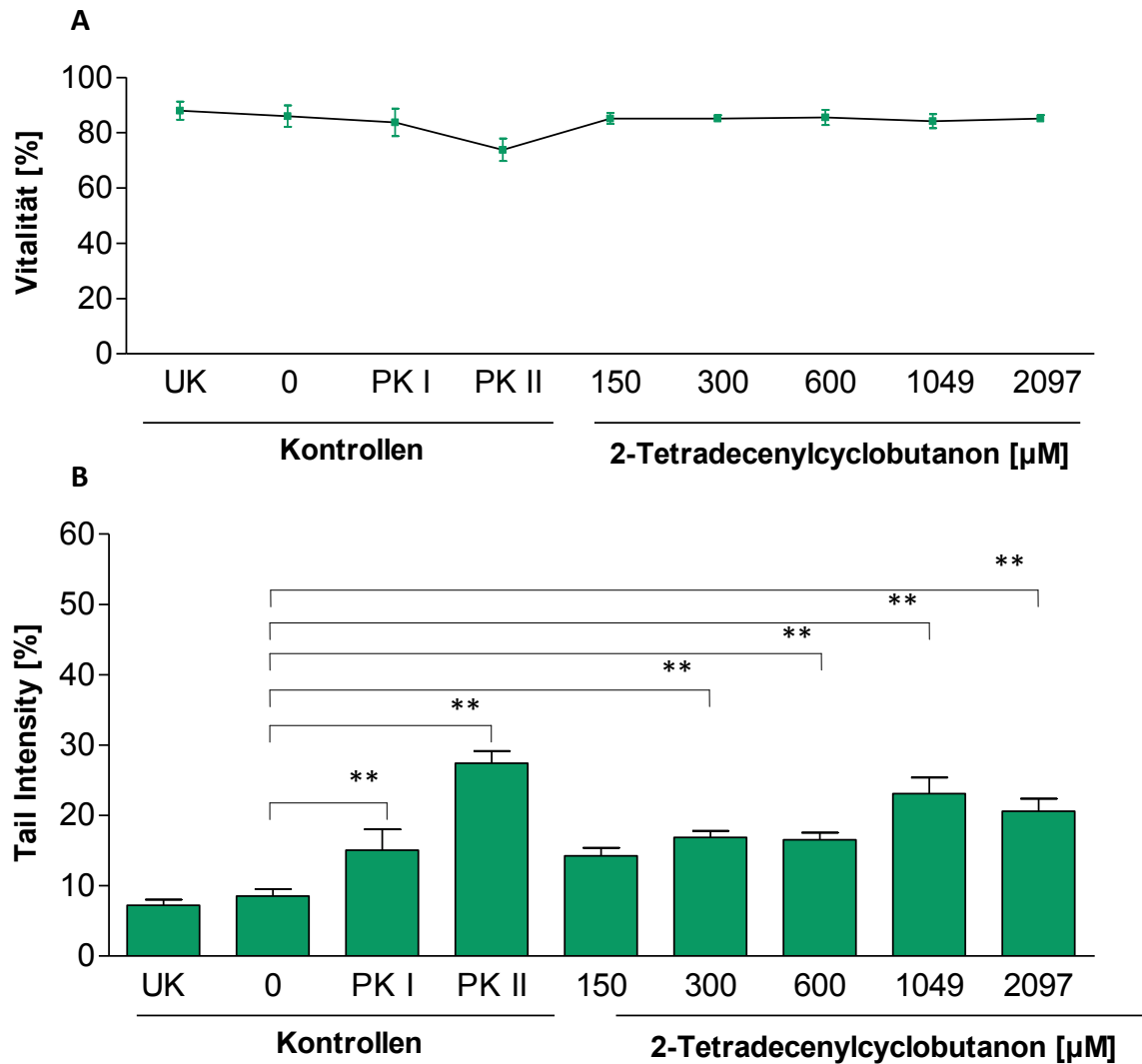


Abbildung 20: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon [n=4]
 [*p<0.05, **p<0.01]

Eine Zunahme der Schäden nach 60 min durch 2tDeCB war nach Berücksichtigung der EtOH-vermittelten Genotoxizität nicht mehr zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Insgesamt kam es sogar zu einer Abnahme der Tail Intensity um den Faktor 1,2. Nach 60 min 1049 μM 2tDeCB verringerten sich die relativen DNA-Schäden signifikant um den Faktor 1,7 gegenüber der 30-minütigen Behandlung. Auch 4-HNE zeigte keine weitere Zeitabhängigkeit.

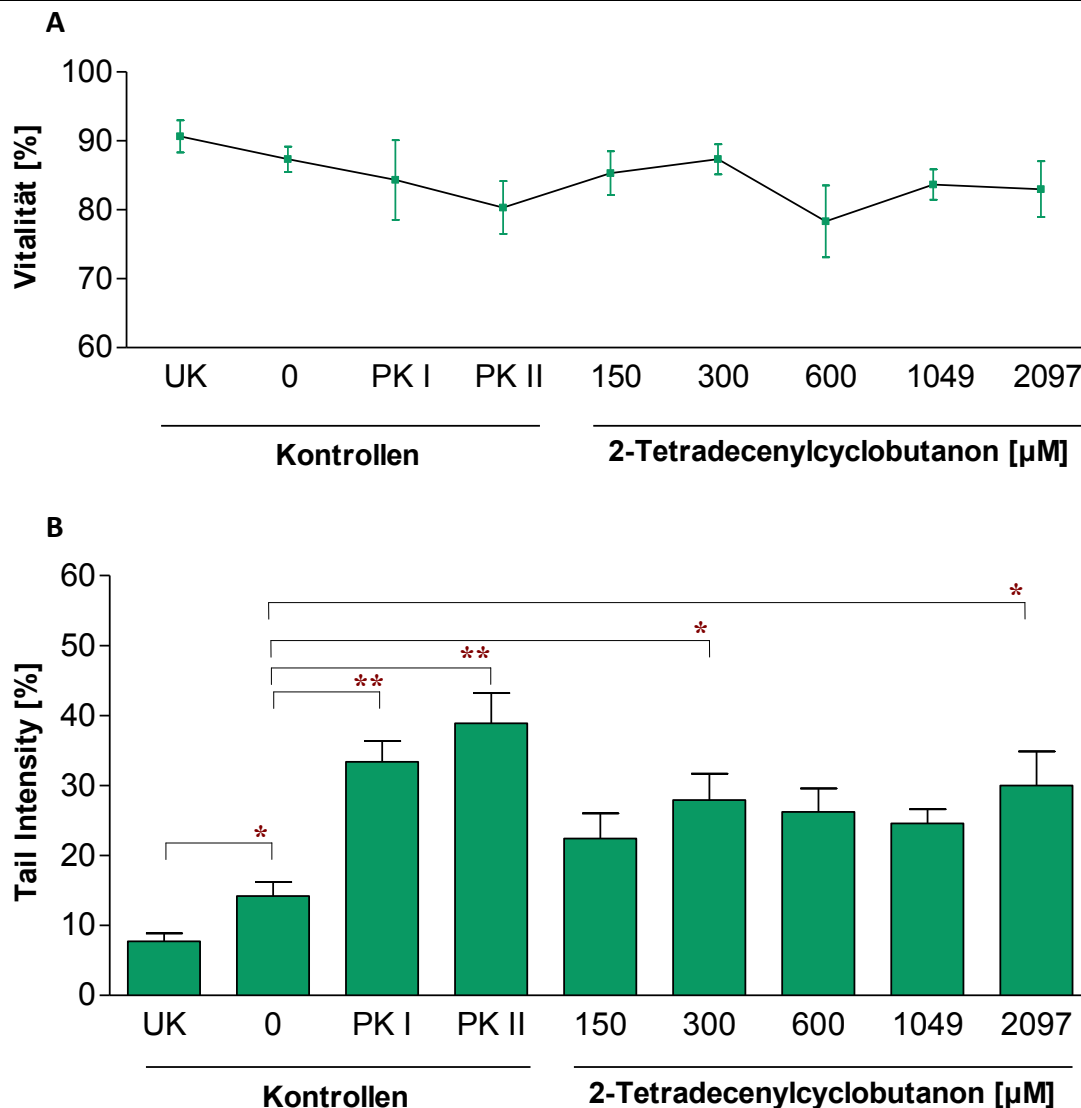


Abbildung 21: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon [n=3]
 [*p<0.05, **p<0.01]

4-Tetradecyl- γ -butyrolakton

Die Untersuchungen zur Wirkung des 4tDBL in LT97 Adenomzellen ergaben nur zwei zur Auswertung geeignete Versuche, da es aufgrund von Abweichungen der ursprünglichen Zellcharakteristika (z. B. morphologische Abweichungen), wahrscheinlich verursacht durch das Alter der Zellen, zu einer veränderten Sensitivität der Zelllinie kam. Dies äußerte sich in einer wesentlich erhöhten Basisrate an DNA-Schäden. Jedoch waren konzentrationsabhängige Effekte messbar. Die beiden in der Abb. 22 zusammengefassten Versuche unterschieden sich zwar in ihrem Basisschadensniveau, jedoch ergibt sich eine deutlichere Vergleichsmöglichkeit aus der Berechnung einer relativen Schädigung (Abb. 23).

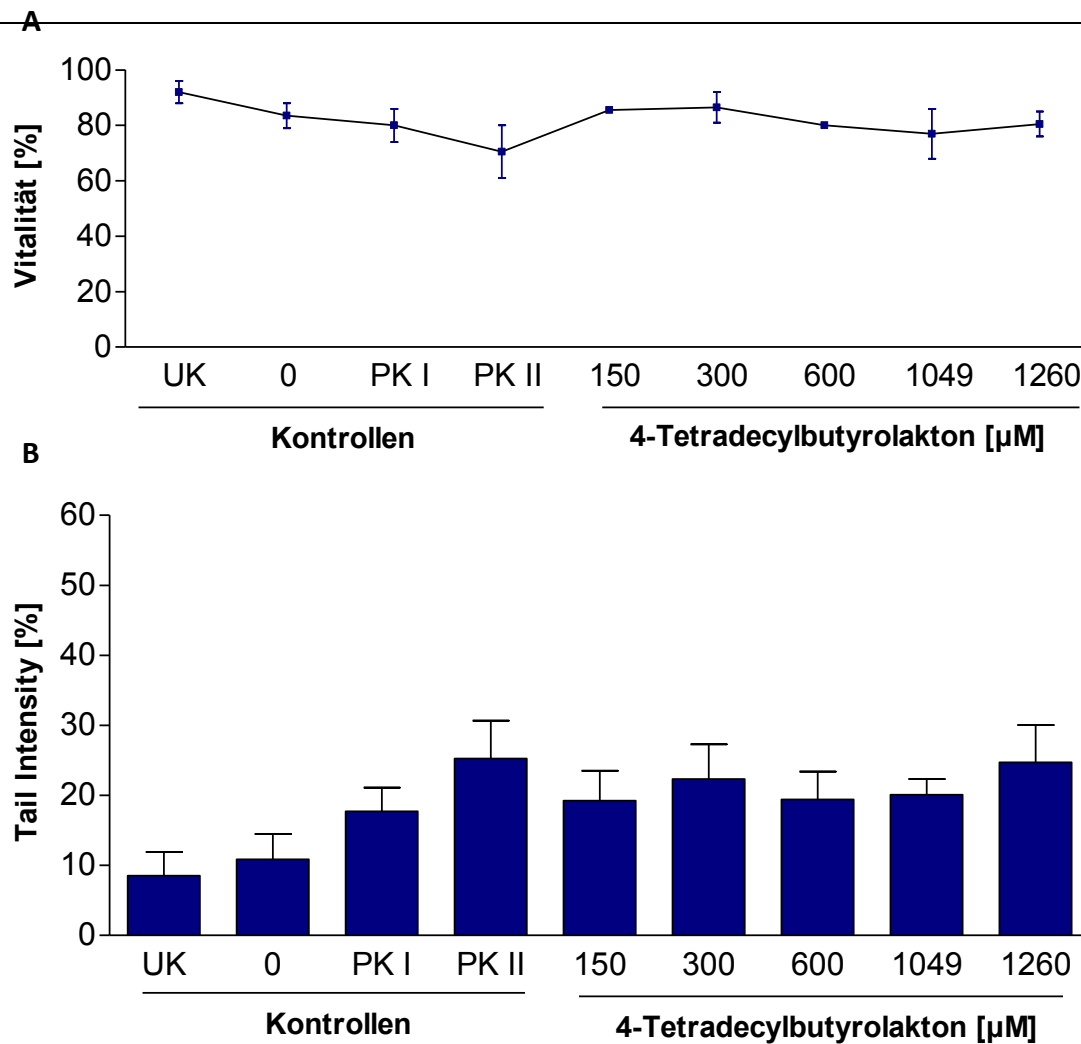


Abbildung 22: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): LT97 Adenomzellen nach 30 min im Comet Assay mit 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton [n=2]

Eine Aussage über eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung ergab die Auswertung der relativierten Werte. Diese zeigte einen deutlichen Anstieg der DNA-Schäden mit zunehmender Konzentration von 4tDBL. Jedoch konnten die beobachteten Effekte aufgrund der unterschiedlichen absoluten Ausgangswerte, welche eine hohe Standardabweichung zur Folge hatten und der geringen Versuchsanzahl von n=2 nicht statistisch abgesichert werden. Eindeutig war das Ergebnis, dass EtOH nach 60 min zweimal mehr DNA-Schäden verursachte als nach 30 min ($20,59 \pm 7,22$; $10,86 \pm 3,65\%$). Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse wurde verzichtet.

3.3.3. Primäre Kolonzellen

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war es, die Wirkungen der radiolytischen Fettsäurederivate in frisch isolierten humanen Kolonzellen zu charakterisieren. In der Versuchsserie mit 2dDCB wurde 4-HNE (100 μ M, 150 μ M) als Positivkontrolle in jedem Experiment mitgeführt und alle Konzentrationen von 2dDCB wurden getestet. Weiterhin wurde die Behandlungsdauer mit den Testsubstanzen auf 60 min erweitert um zeitabhängige Veränderungen der DNA-Schäden zu beobachten. Da im Konzentrationsbereich zwischen 100 und 300 μ M im Vorversuch kein Unterschied in den messbaren DNA-Schäden zu beobachten war, wurde auf die Untersuchung der Konzentrationen 200 und 250 μ M verzichtet. Die statistische Überprüfung der Zusammenhänge erfolgte analog den Angaben zur LT97 Versuchsserie.

2-Dodecylcyclobutanon

Für die Untersuchung genotoxischer Effekte von 2dDCB in frisch isolierten humanen Kolonepithelzellen nach 30-minütiger Exposition wurden Kolongewebeproben von 5 unterschiedlichen Donoren verwendet (\bar{x} 64,6 \pm 18,2 Jahre, 1 männlich, 4 weiblich). Zwei weitere Gewebeproben konnten für die 60 min Inkubation verwendet werden (\bar{x} 55,5 \pm 4,9 Jahre, 1 männlich, 1 weiblich).

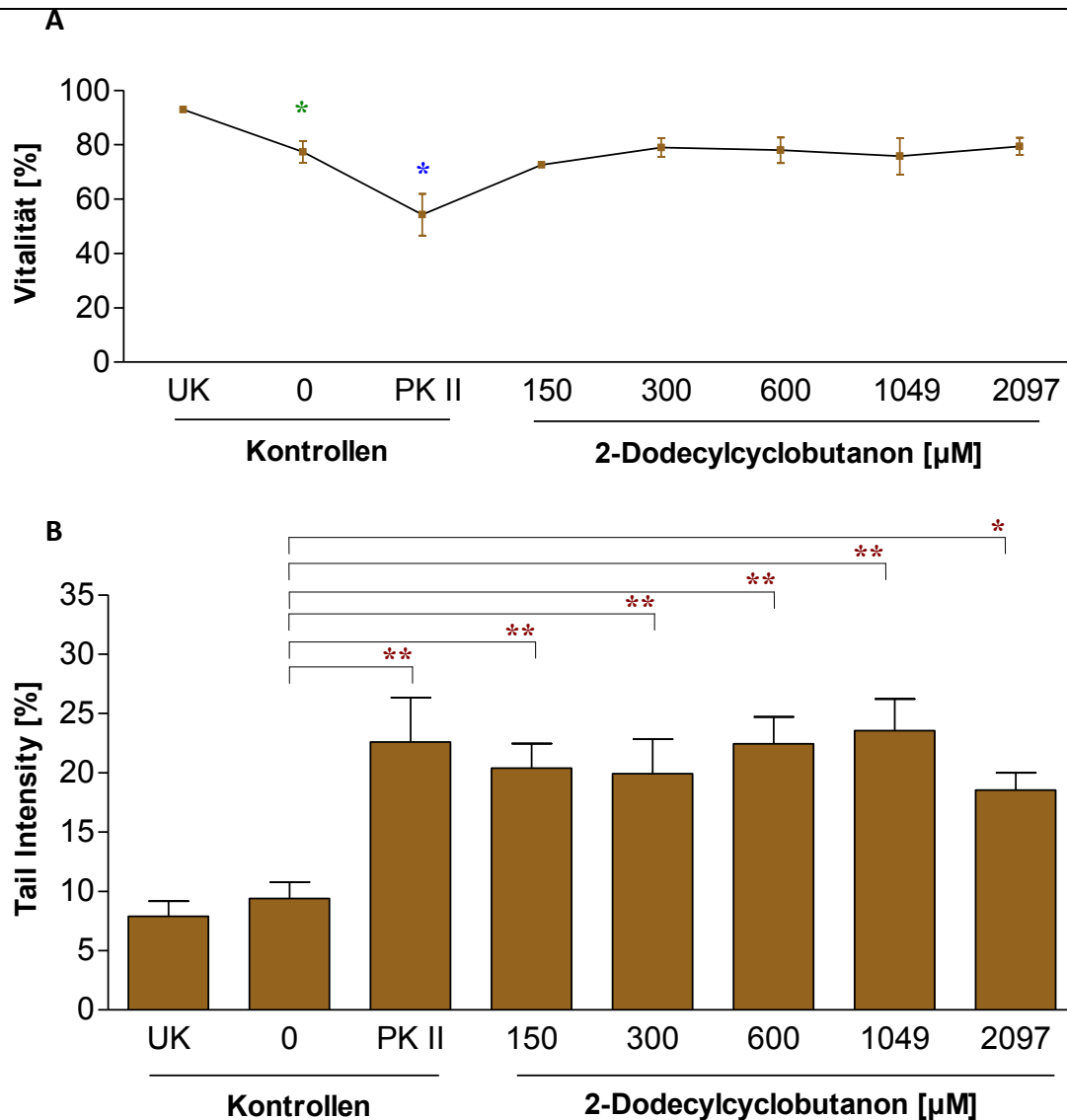


Abbildung 23: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon [n=5]
 [*p<0.05, **p<0.01]

In den frisch isolierten humanen Kolonepithelzellen erwies sich 2dDCB als signifikant genotoxisch (Abb. 23). Eine Zunahme der DNA-Schäden in Abhängigkeit von der Konzentration war nur tendenziell erkennbar (19,92±2,90%; 300 µM, 23,54±2,67%; 1049 µM) jedoch nahm die DNA-Schädigung durch 2dDCB nach Inkubation mit der höchsten Konzentration wieder (18,54±1,47%; 2097µM) ab.

Die Basisschäden unterschieden sich nicht von den in den LT97 Adenomzellen gemessenen Grundschädigungen (9,40±1,37 und 7,23±0,64%). Die Vitalität wurde durch 2dDCB nicht beeinträchtigt, aber EtOH verminderte die Vitalität signifikant auf 77,4±4,0 %. Eine Behandlung der Zellen mit der in EtOH gelösten Testsubstanz resultierte jedoch nicht in einer messbaren Zytotoxizität. Basierend auf den ersten Ergebnissen zur Zytotoxizität von 2dDCB in Primärzellen, wurde für weitere Untersuchungen zur Induktion von Schäden in Abhängigkeit von der Zeit der EtOH-Anteil im Kulturmedium auf 2% herabgesetzt. Die

maximal testbare Konzentration war daher 1049 μM 2dDCB. Die Abb. 24 stellt die Ergebnisse zur 60-minütigen Exposition der Kolonepithelzellen gegenüber dem Cyclobutanon dar.

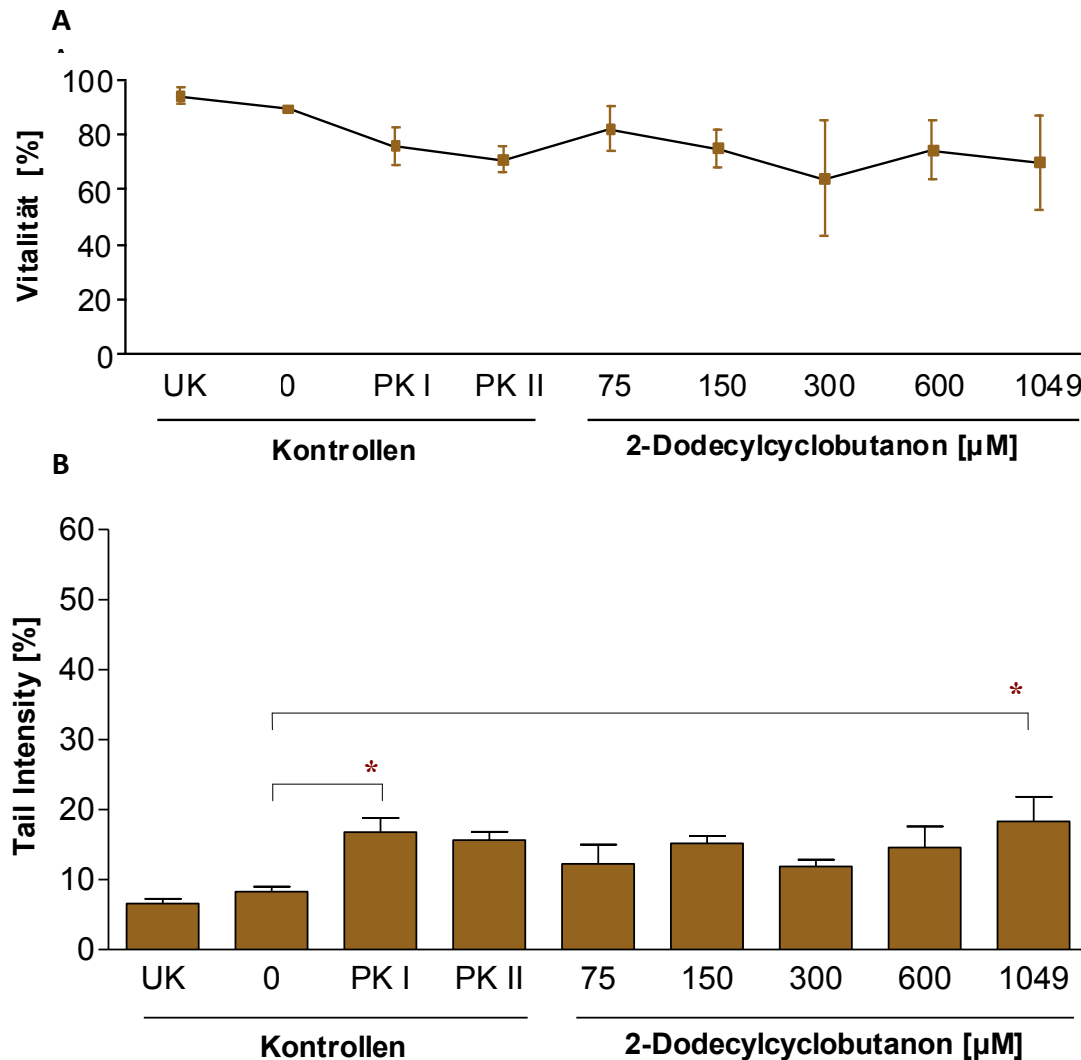


Abbildung 24: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Dodecylcyclobutanon (2% EtOH) [n=2]
[Tail Intensity (%): *p<0.05, **p<0.01]

Gegenüber 2dDCB zeigten die Zellpopulationen der beiden Spender unterschiedliche Sensitivitäten, wie die Vitalitätswerte in der Abb. 24A zeigen. Während in der ersten Probe nach 60 min keine Beeinträchtigung der Vitalität zu beobachten war, induzierte 2dDCB in der zweiten Probe irreversible Membranschäden, so dass es zu einer Verminderung der Vitalität der Zellen auf <70% kam. Dies spiegelt sich auch in den gemessenen DNA-Schäden wider. Nach 60 min wirkten nur 1049 μM 2dDCB genotoxisch in primären Kolonzellen. Beide Positivkontrollen verursachten signifikante DNA-Schäden.

2-Tetradecylcyclobutanon

Zur Untersuchung von 2tDCB standen 4 Gewebeproben (\bar{x} 57,0 \pm 5,9 Jahre, 2 männlich, 2 weiblich) zur Verfügung. 2tDCB induzierte nach 30 min dosisabhängig DNA-Schäden in den Kolonzellen (Abb. 25). Signifikant erhöhte Schäden wurden ab einer Konzentration von 600 μ M 2tDCB gesetzt (19,97 \pm 3,20%). Für das Lösungsmittel EtOH wurde weder eine zytotoxische noch eine genotoxische Wirkung nachgewiesen.

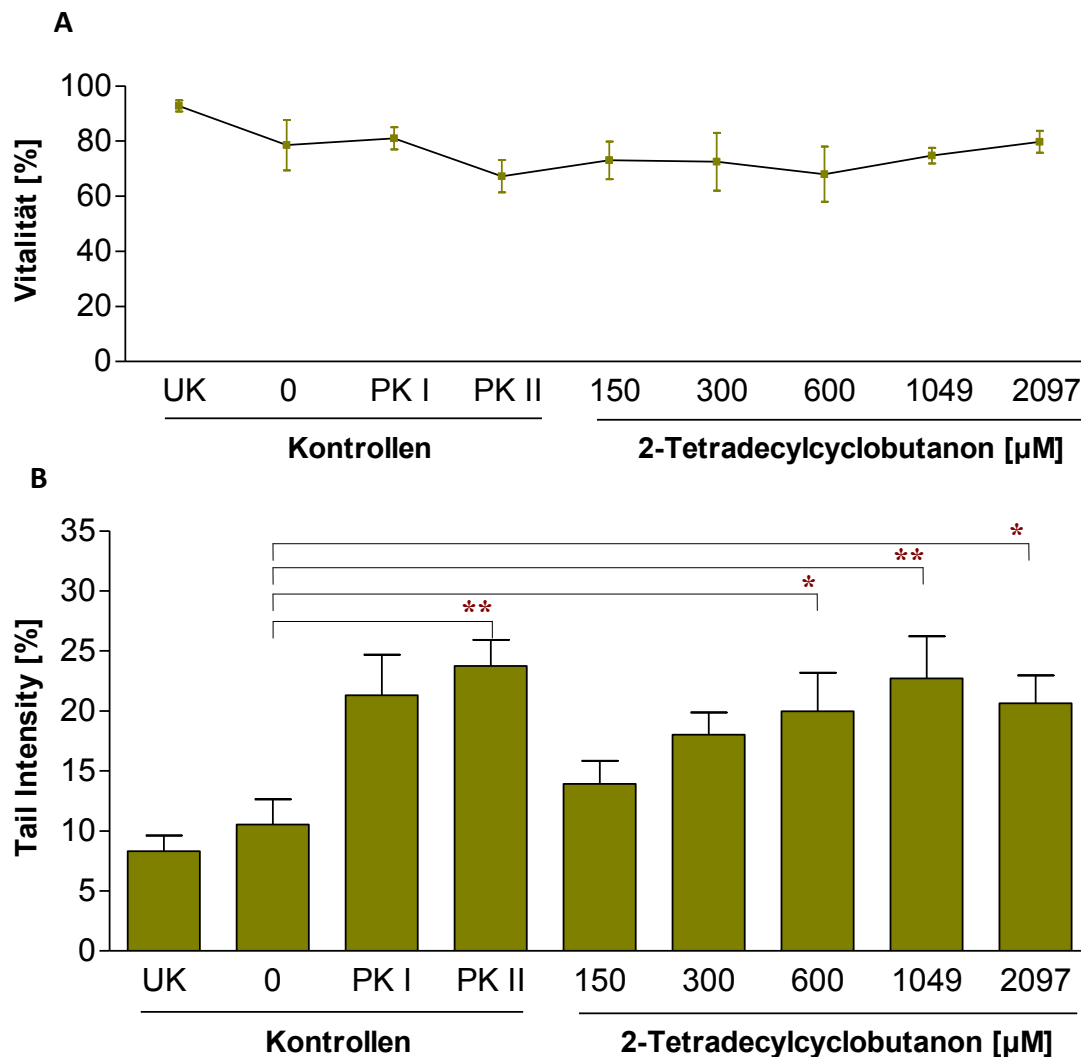


Abbildung 25: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=4]
 [*p<0.05, **p<0.01]

Für die Untersuchung der Induktion von DNA-Strangbrüchen nach einer 60-minütigen Inkubation wurden nochmals Gewebeproben von zwei Donoren (\bar{x} 59,0 \pm 8,5 Jahre, 1 männlich, 1 weiblich) aufgearbeitet.

Der statistischen Vergleich der vorliegenden Daten (n=2) mit je drei parallelen Werten je Konzentration ergab, den in der Abb. 26 angezeigten Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung. Die zuvor beschriebene zytotoxische Wirkung von 2tDCB in frisch isolierten

primären Kolonzellen nach Inkubation mit 2097 μM nach 60 min war in den hierfür verwendeten Proben nicht aufgetreten, doch ist eine tendenzielle Abnahme der Vitalität der Zellen ersichtlich. Stärker zytotoxisch wirkte in beiden Konzentrationen die Positivkontrolle. Die genotoxische Wirkung der Kontrolle war nicht eindeutig nachzuweisen.

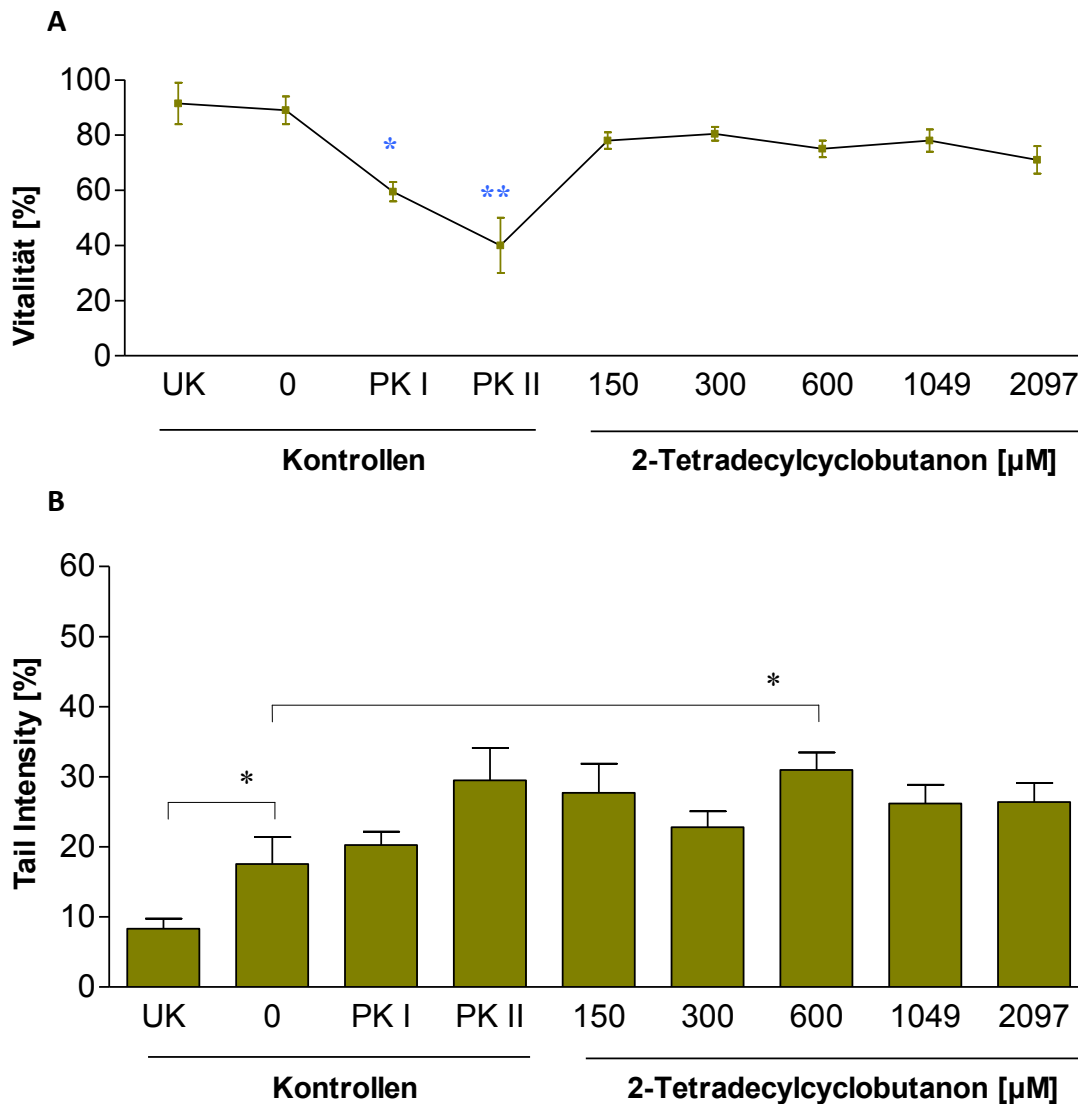


Abbildung 26: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 60 min im Comet Assay mit 2-Tetradecylcyclobutanon [n=2]
 [*p<0.05; **p<0.01]

Da die EtOH-Kontrolle nach 60 min zu genotoxischen Schäden führte, wurde die relative DNA-Schädigung bezogen auf die EtOH-Kontrolle als normalisierte Daten für beide Inkubationszeiten berechnet (Daten nicht gezeigt). Die relative Auswertung der Daten bestätigte, dass 2tDCB nach 60 min im Comet Assay nur nach 600 μM signifikanten DNA-Schäden induzierte. Darüber hinaus schädigten beide Positivkontrollen signifikant die DNA.

2-Tetradecenylcyclobutanon

Im Folgenden wurden nur die Daten der 30-min-Inkubation zur Auswertung herangezogen. Da es bereits nach 60 min zu einer starken Abnahme der Vitalität der Zellen durch 2tDeCB kam, kann eine Beeinflussung der DNA-Schädigung durch diese Zytotoxizität nicht ausgeschlossen werden. Nach Inkubation der Zellen aus den beiden Gewebeproben (Spender 1: 89 Jahre, weiblich; Spender 2: unbekannt) zeigten die Kolonzellen DNA-Schäden auf sehr unterschiedlichem Niveau. Darüber hinaus setzte auch EtOH im Vergleich zur unbehandelten Mediumkontrolle signifikante Schäden ($5,65 \pm 1,71\%$ und $14,85 \pm 1,38\%$; $n=2$; Daten nicht gezeigt). Die relative Bewertung der DNA-Schädigung durch die Testsubstanz im Vergleich zum Lösungsmittel soll mögliche 2tDeCB-induzierte Effekte verdeutlichen. Diese sind der Abb. 27 zu entnehmen.

Für 2tDeCB konnten in Primärzellen keine dosisabhängigen DNA-Schäden nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle resultierte nur eine Exposition der Zellen gegenüber einer Konzentration von $600 \mu\text{M}$ in einer signifikant erhöhten DNA-Schädigung ($14,85 \pm 1,38$ und $24,43 \pm 2,56\%$)

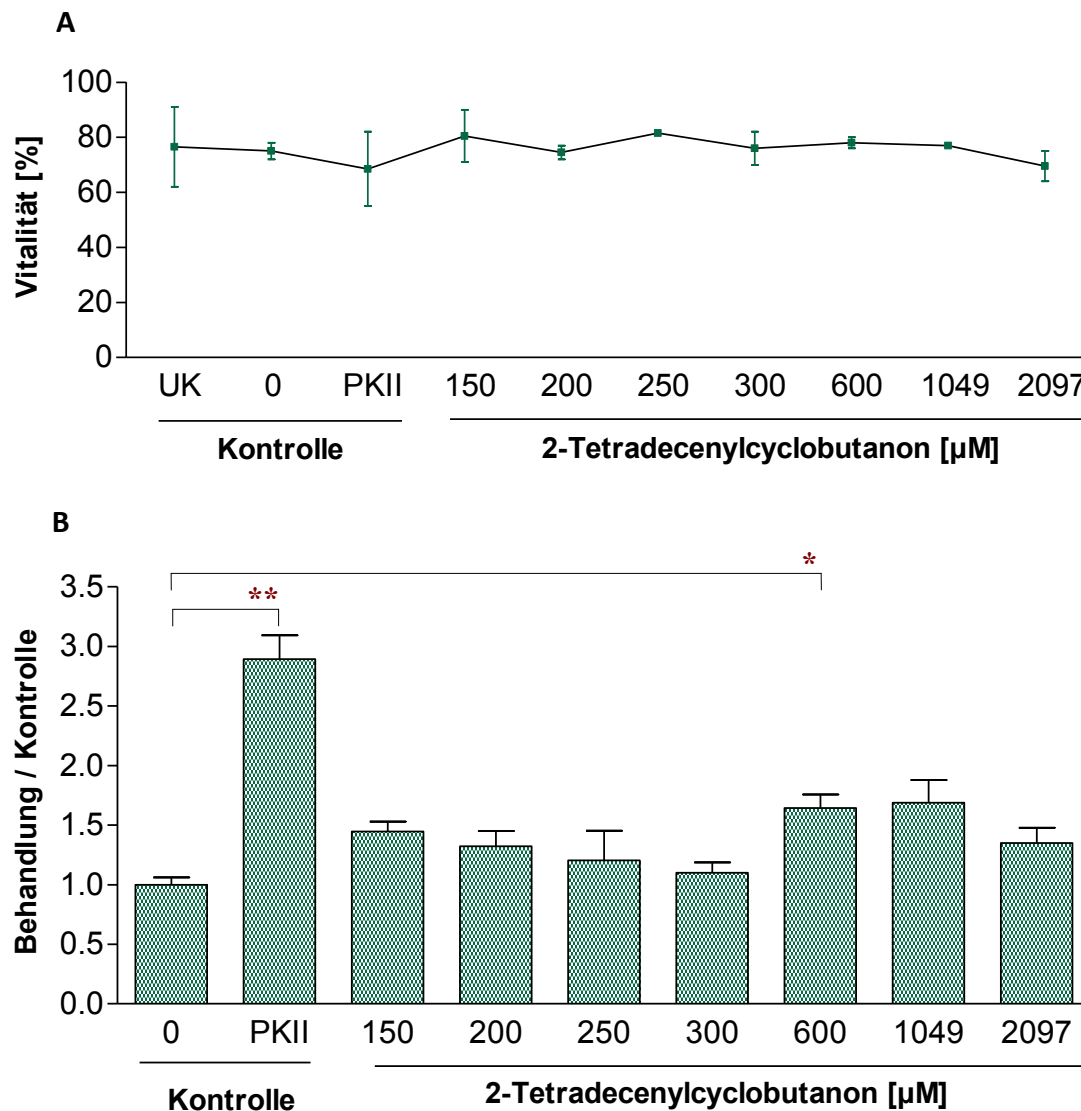


Abbildung 27: Vitalität (A) und relative DNA-Schädigung (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 2-Tetradecenylcyclobutanon [n=2]
[*p<0.05, **p<0.01]

4-Tetradecyl- γ -butyrolakton

Für die Untersuchung der Genotoxizität von 4tDBL nach 30 min standen 3 Gewebeproben ($\varnothing 71,0 \pm 12,1$ Jahren, 2 männlich, 1 weiblich) zur Verfügung.

4tDBL zeigte in primären Kolonepithelzellen nach 30 min genotoxische Wirkungen, welche nicht konzentrationsabhängig waren (Abb. 28). Die Positivkontrollen hingegen induzierten konzentrationsabhängig DNA-Schäden, wobei nach 150 μM 4-HNE auch signifikante Membranschäden nachweisbar waren.

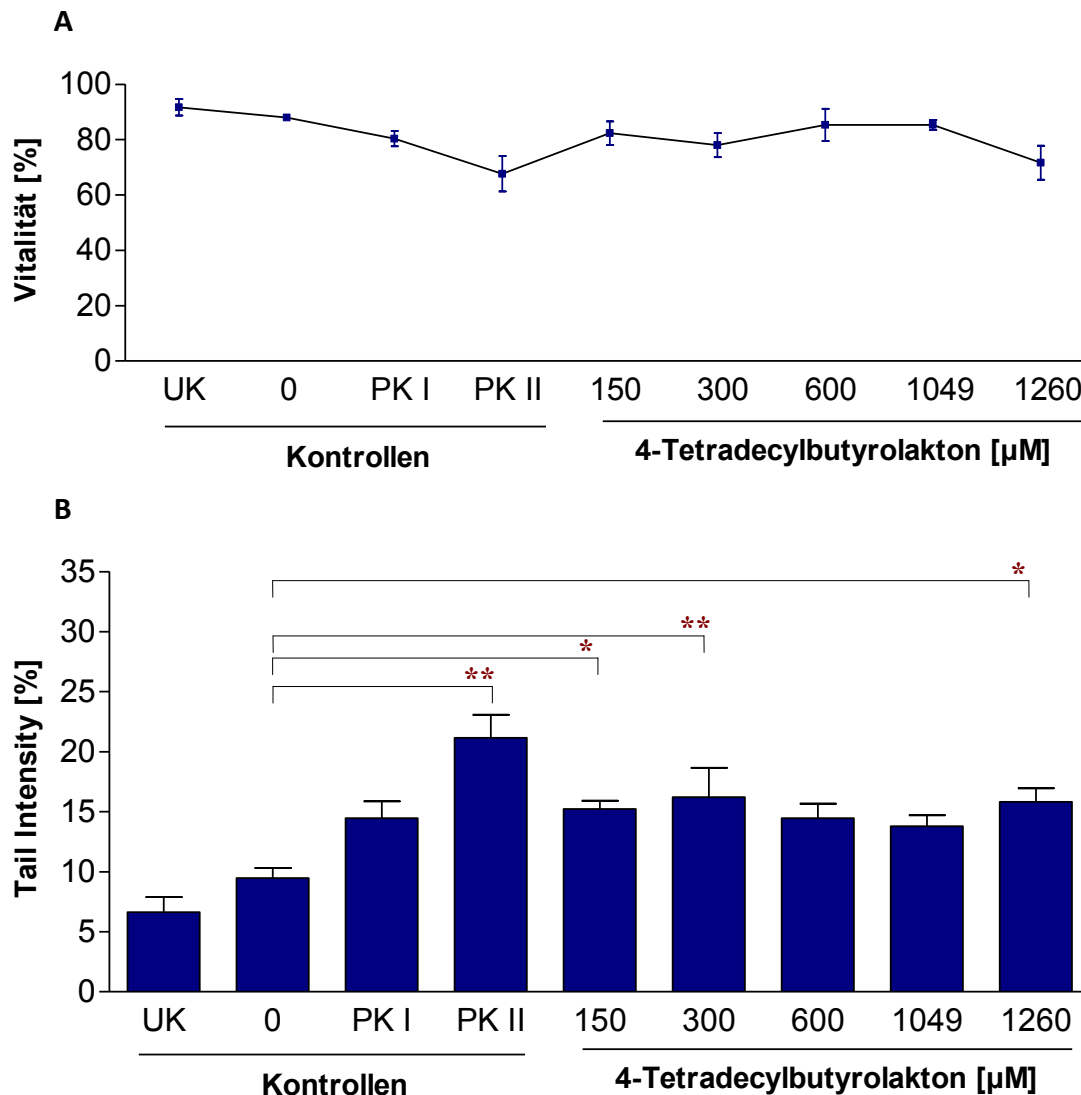


Abbildung 28: Vitalität (A) und Genotoxizität (B): primäre Kolonzellen nach 30 min im Comet Assay mit 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton [n=3]
[*p<0.05, **p<0.01]

Im Versuchsansatz mit 60 min Behandlungszeit (ohne Abbildung) reagierten die Zellen in zwei von drei Versuchen stark auf EtOH. Die beobachteten genotoxischen Effekte durch EtOH waren auch im Vergleich (n=3) signifikant ($5,72 \pm 0,90\%$ und $11,58 \pm 1,09\%$; $p < 0.0009$, ungepaarter t-test mit Welch's correction). Zum Vergleich der zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmten DNA-Schäden erfolgte eine Normalisierung der Daten auf die EtOH-Kontrollen, so dass die Faktoren die reine DNA-Schädigung durch die Testsubstanz widerspiegeln. Die relative DNA-Schädigung nach 30 und 60 min im Vergleich können der Abb. 29 entnommen werden.

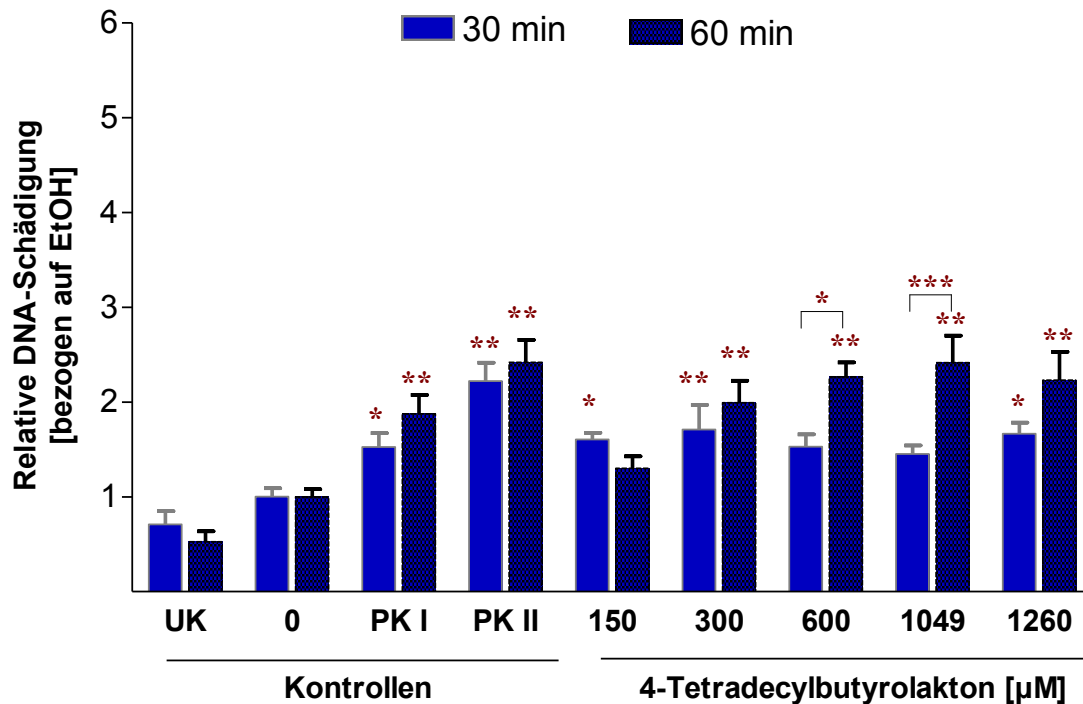


Abbildung 29: Relative DNA-Schädigung durch 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton in primären Kolonzellen nach 30 und 60 min im Comet Assay [n=3]
[*p<0.05, **p<0.01; ***p<0.001]

Nach beiden Behandlungszeiten wurden durch 4tDBL signifikante DNA-Schäden in Primärzellen induziert. Im Vergleich zur 30-minütigen Behandlung war eine signifikante zeitabhängige Erhöhung der DNA-Schäden nach 60 min nur nach einer Behandlung mit 600 und 1049 μ M nachweisbar. Nach Normalisierung der Daten führten Konzentrationen ≥ 300 μ M zu signifikanten, tendenziell steigenden DNA-Schäden. Auch in dieser Versuchserie setzte 4-HNE konzentrationsabhängig Schäden in den Zellen, welche nach 60 min leicht zunahmen.

3.4. Einfluss des Glutathion-/Glutathion S-Transferase Enzymsystems auf die Genotoxizität der 2-Alkylcyclobutanone

Studien an HT29 Kolontumorzellen zeigten, dass die Induktion von DNA-Strangbrüchen im Comet Assay durch 4-HNE durch eine Behandlung der Zellen mit Butyrat vermindert werden konnte [150]. Dieser Effekt war auf die Induktion verschiedener Glutathion S-Transferase (GST)-Isoformen, nämlich der GSTM2, GSTP1 und der GSTA1/2, zurückzuführen, welche maßgeblich an der Metabolisierung des 4-HNE beteiligt sind [151]. Dem gegenüber erhöhte ein verminderter Glutathion- (GSH) Status die genotoxische Wirkung des 4-HNE in diesen Kolontumorzellen [135]. Ob dieser Zusammenhang auch in LT97 Adenomzellen hinsichtlich des genotoxischen Wirkpotenzials der 2-Alkylcyclobutanone (2ACB) besteht, sollte mit Versuchsansätzen analog der früheren Studien geklärt werden. Zur Klärung der Frage, welche

Rolle das GSH System bei der Metabolisierung von 2ACB in den verschiedenen Kolonzelltypen spielt, wurde der Gehalt an zellulärem reduzierten GSH nach einer Inkubation der Zellen mit 2dDCB bestimmt [135].

Die Abb. 30 gibt einen Überblick über die GSH-Gehalte verschiedener Kolonzelltypen, welche im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen ermittelt wurden.

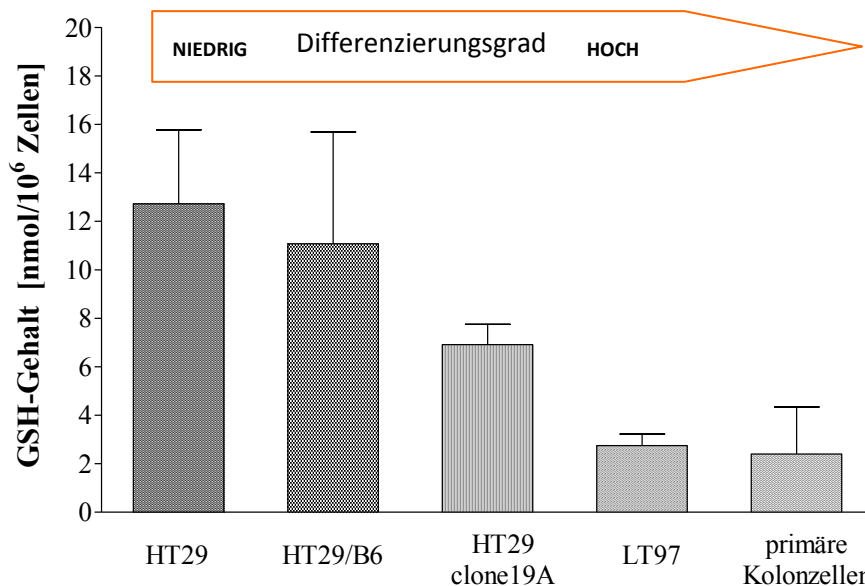


Abbildung 30: Basale Glutathiongehalte in den verwendeten Kolonzellsystemen [n ≥ 2]

Der Gehalt an reduziertem GSH nimmt mit Zunahme des Differenzierungsgrades der Zellen ab. Die permanente undifferenzierte Kolonkrebszelllinie wies den höchsten Gehalt auf. Den geringsten GSH-Gehalt zeigten die primären humanen Kolonzellen. Dieser war vergleichbar mit dem der LT97 Zellen. Ob diese einen Einfluss auf das genotoxische Potenzial der 2ACB hat, sollte anhand vergleichender Untersuchungen mit HT29clone19A, LT97 und primären Zellen untersucht werden.

3.4.1. Modulation des Glutathion-Status in human Kolonzellen durch 2-Alkylcyclobutanone

Durch Erfassung des GSH-Gehaltes der mit 2ACB behandelten Kolonzellen (30 und 60 min) wurde untersucht ob das zelluläre reduzierte Glutathion an der Metabolisierung der 2ACB beteiligt sein könnte. Hierfür wurden HT29clone19A Zellen (Abb. 31A), LT97 Adenomzellen (Abb.31B) und primäre Kolonepithelzellen (Abb. 31C) mit ausgewählten Konzentrationen von 2dDCB für 30 und 60 min behandelt und anschließend der GSH-Gehalt colorimetrisch bestimmt.

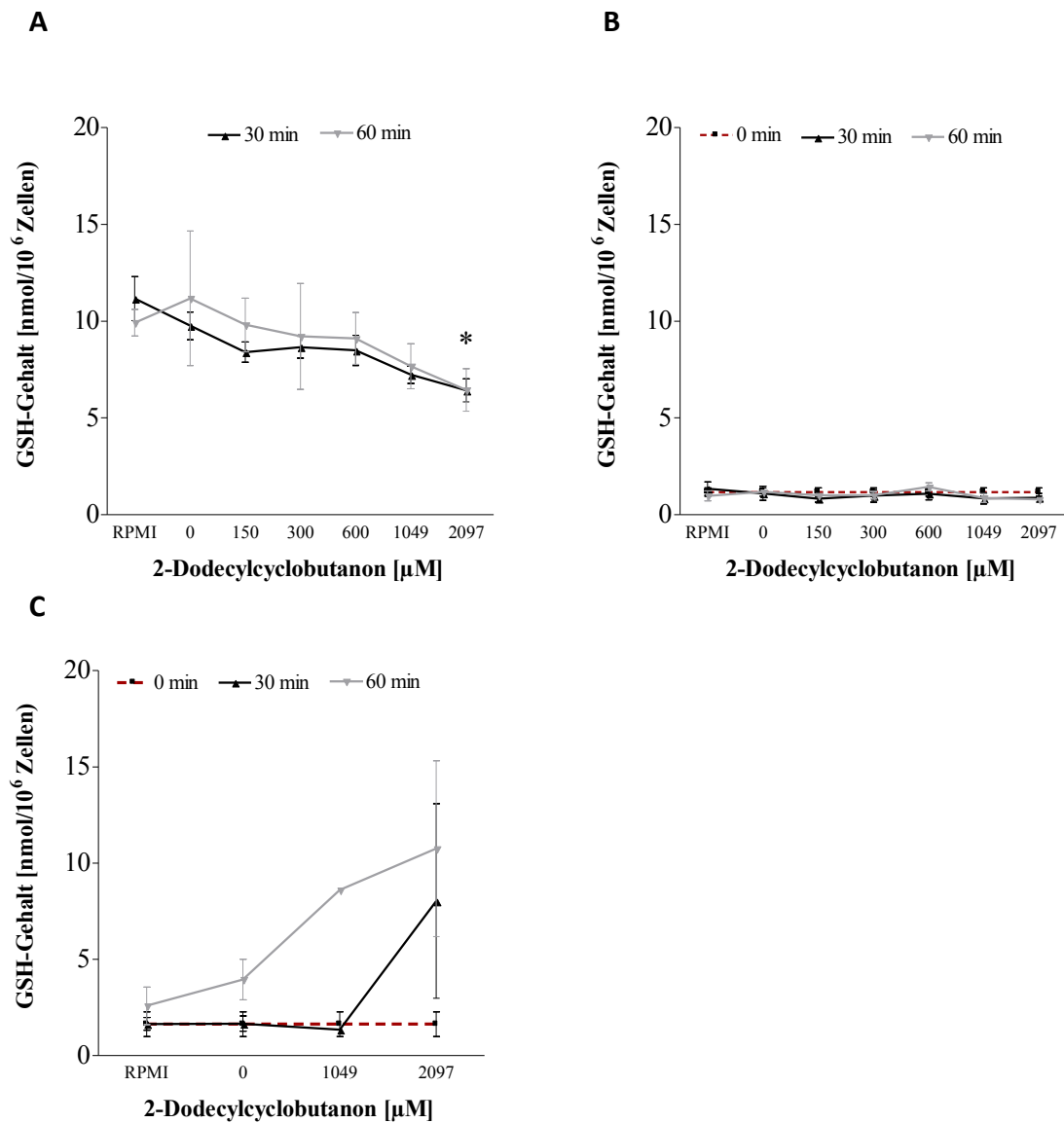


Abbildung 31: Glutathiongehalte nach Behandlung der Zellen mit 2dDCB für 30 und 60 min
A) HT29clone19A; B) LT97 Adenomzellen, C) primäre Kolonepithelzellen
 [*p<0.05]

Ein Effekt auf den GSH-Status wurde nur nach Inkubation der HT29clone19A Zellen mit 2dDCB gefunden. Hier kam es nach 30 min zu einer signifikanten Verminderung des GSH-Gehaltes von $9,76 \pm 1,24 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}$ (EtOH-Kontrolle) auf $6,44 \pm 1,04 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}$. Die EtOH-Kontrolle im 60-min Ansatz zeigte eine hohe Standardabweichung, jedoch war der GSH-Gehalt nach 2097 µM 2dDCB am geringsten. In LT97 Zellen war keine Veränderung messbar. In den primären Kolonzellen kam es nach Exposition der frisch isolierten Zellen gegenüber dem 2dDCB in Abhängigkeit von den einzelnen Spendern zu einem zeit- und konzentrationsabhängigen Anstieg des GSH.

3.4.2. Hemmung der Glutathion-Neusynthese durch Buthioninsulfoximin – Auswirkungen auf die Genotoxizität von 2-Dodecylcyclobutanon in HT29clone19A Zellen

Vorangegangene Studien an HT29 Kolonzellen zeigten einen signifikanten, inversen Zusammenhang zwischen einem depletierten GSH-Status und der durch 4-HNE induzierten DNA-Schädigung [135]. Die DNA-Schäden erhöhten sich um den Faktor zwei, wenn die Zellen vor der Behandlung mit 4-HNE für 18 Stunden in BSO-haltigem Medium kultiviert wurden. Analog sollte in der vorliegenden Arbeit dieser Zusammenhang zwischen GSH und den genotoxischen Effekten durch die 2ACB herausgestellt werden.

Die Abb. 32 zeigt die GSH-Analyse der Kontroll- und der BSO vorbehandelten Zellen, die parallel im Comet Assay mit 2dDCB behandelt wurden (n=5). Hiermit war die Effektivität der BSO-Behandlung belegt.

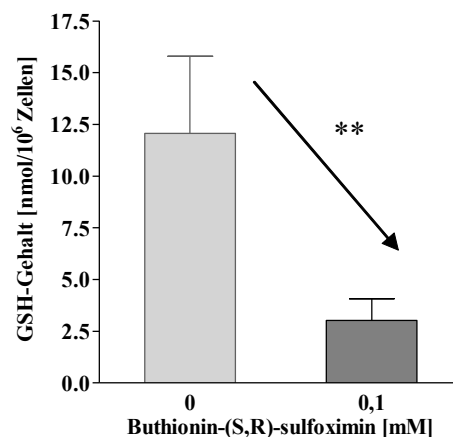


Abbildung 32: GSH-Gehalt der im Challenge Assay verwendeten HT29clone19A Zellen nach 18 Stunden Vorbehandlung mit 0,1 mM BSO [n=5]
[**p<0.01]

Das zelluläre GSH wurde im Mittel um 75% von 12,05± 2,49 auf 3,02±0,71 nmol/10⁶ Zellen gesenkt. Die Abb. 33 zeigt die DNA-Schäden in den Kontrollzellen und in den GSH-depletierten Zellen nach einer Behandlung mit 2dDCB (30 min, 37°C). Auf eine erneute Betrachtung der HT29clone19A Zellen mit unverändertem GSH-Gehalt im Comet Assay wurde verzichtet. Die in BSO-freiem Medium kultivierten HT29clone19A Zellen reagierten weder auf die Behandlung mit 4-HNE, noch mit 2dDCB mit einer signifikanten Schädigung der DNA (siehe auch Seite 47, Abb.14). In GSH-depletierten HT29clone19A Zellen hingegen war nach Inkubation mit der Positivkontrolle (150 µM 4-HNE) eine signifikante Zunahme der DNA-Strangbrüche von 5,56±1,01% auf 11,60±2,19% zu sehen. 2dDCB induzierte auch in GSH-depletierten Zellen keine DNA-Strangbrüche.

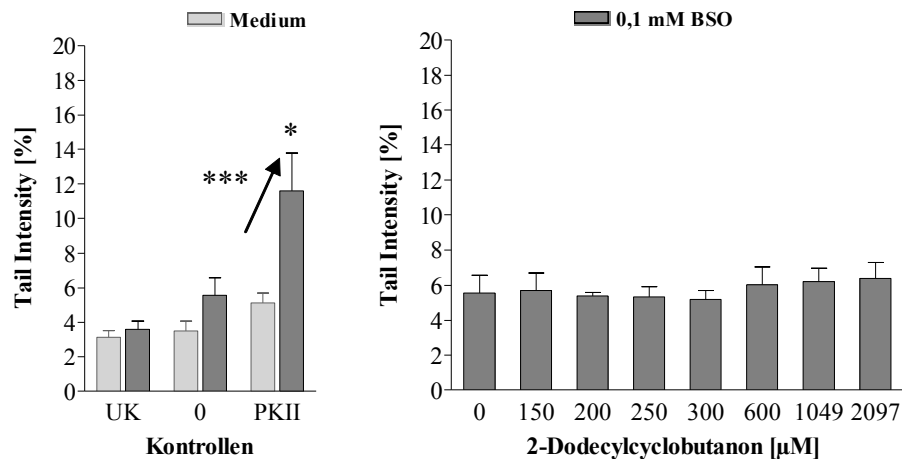


Abbildung 33: DNA-Schädigung in den Kontrollzellen (helle Säulen) im Vergleich zu GSH-depletierten HT29clone19A Zellen (dunkle Säulen) durch 2-Dodecylcyclobutanon.
 [*p<0.05 (ungepaarter t-Test); ***p<0.001 (Two-way ANOVA/ Bonferroni's post Test)]

Vergleichbare Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen mit 2tDCB. Wie in der Abb. 34 zu sehen, konnte auch hier nur eine Zunahme der DNA-Schäden nach Inkubation der GSH-depletierten Zellen mit der Positivkontrolle nachgewiesen werden, wohingegen in 2tDCB-behandelten HT29clone19A Zellen mit GSH-Depletion keine Schäden auftraten.

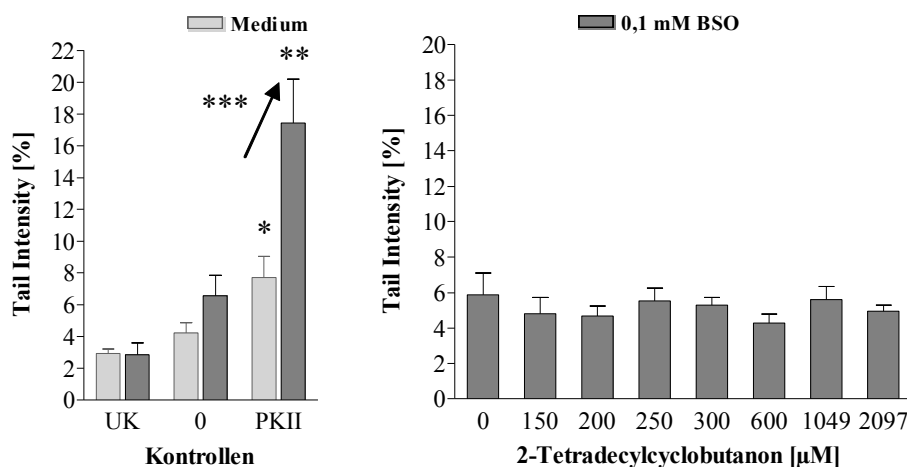


Abbildung 34: DNA-Schädigung in den Kontrollzellen (helle Säulen) im Vergleich zu GSH-depletierten HT29clone19A Zellen (dunkle Säulen) durch 2-Tetradecylcyclobutanon.
 [*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001]

3.4.3. Induktion des Glutathion S-Transferase Systems in LT97 Zellen durch Butyrat

Das Fermentationsprodukt Butyrat zeigt *in vitro* spezifische krebshemmende Eigenschaften. Es fördert die Differenzierung und die Apoptoseinduktion und hemmt das Wachstum von Tumorzellen („suppressing agent activity“). Oder es schützt die Zellen direkt oder indirekt vor genotoxischen Einflüssen karzinogener Risikofaktoren, indem es das Phase II-Enzymsystems

der Glutathion S-Transferasen induziert („blocking agent activity“) [108]. *EBERT ET AL.* konnten die Induktion der GST in HT29 Zellen und in primären humanen Kolonfibroblasten durch 4 mM Butyrat nach 72 Stunden zeigen.

Zunächst wurde die Wirkung von Butyrat in der Adenomzelllinie nach einer 24-stündigen Inkubationsdauer untersucht. Hierfür wurde in vier Einzelansätzen sowohl die GST-Gesamtaktivität (Abb. 35) als auch das Gesamtprotein (Abb. 36A) der Zellen vor und nach der Behandlung mit 1 und 2 mM Butyrat ermittelt.

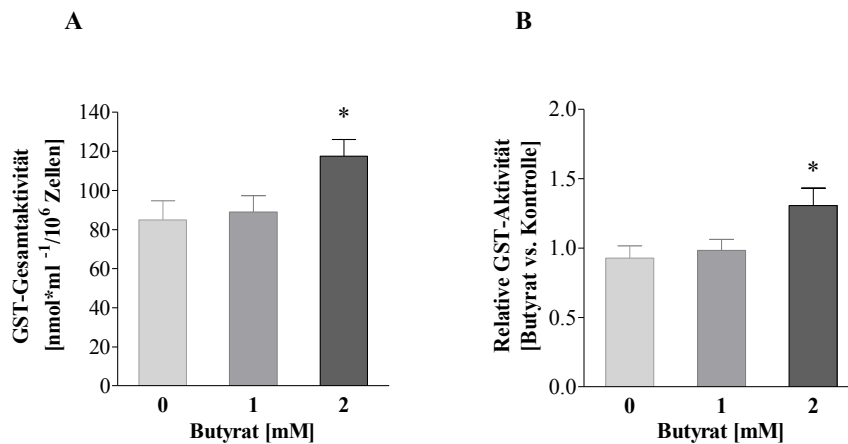


Abbildung 35: GST-Gesamtaktivität in LT97 Adenomzellen nach Behandlung mit Butyrat für 24 h, [*p<0.05]

Die Behandlung der LT97 Zellen mit 2 mM Butyrat für 24 h resultierte gegenüber der Kontrolle in einer signifikanten Zunahme der GST-Gesamtaktivität auf das 1,3-Fache ($117,59 \pm 8,51$ nmol/min⁻¹ je 10⁶ Zellen). Darüber hinaus konnte für die konzentrationsabhängige Aktivitätszunahme mittels einer One-way ANOVA mit p=0,0295 (absolut) und p=0,0252 (relativ) ein linearer Trend ermittelt werden.

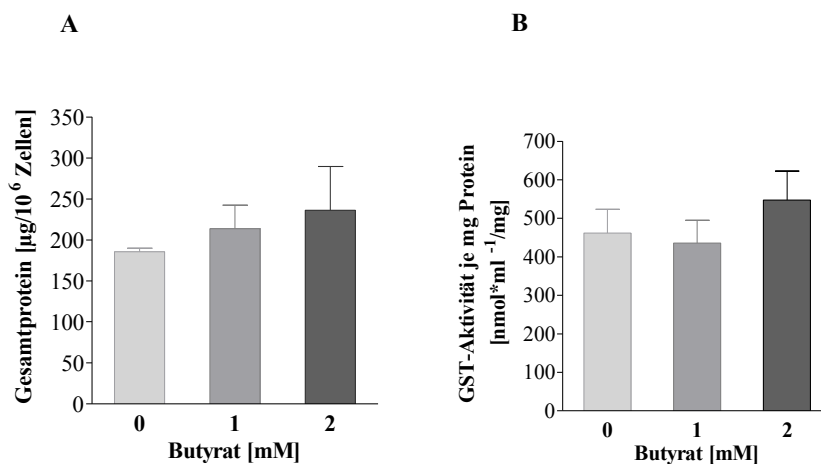


Abbildung 36: A) Gesamtproteingehalt und B) GST-Aktivität pro mg Gesamtprotein in LT97 Adenomzellen nach Behandlung mit Butyrat für 24 h

Der zelluläre Gesamtproteingehalt stieg nach einer Behandlung mit Butyrat (2 mM) nur leicht an und war gegenüber der Mediumkontrolle nicht signifikant erhöht (Abb. 36 A). Bezogen auf 1 mg Protein kam es zu keiner signifikant erhöhten GST-Gesamtaktivität (Abb. 36 B). Eine Induktion des GST-Systems war somit nur auf zellulärer Ebene nachweisbar.

3.4.4. Modulation der 2-Alkylcyclobutanon-vermittelten Genotoxizität in LT97 Zellen nach Induktion des Glutathion S-Transferase Systems durch Butyrat

Analog bereits erfolgreich durchgeführter Experimente, welche einen signifikant besseren Schutz von HT29 Tumorzellen gegenüber 4-HNE nach Induktion des GST-/GSH Enzymsystems nachweisen konnten [150-151], wurden LT97 Adenomzellen nach 24-stündiger Butyratbehandlung mit ausgewählten Konzentrationen der potenziell genotoxischen Substanzen 4-HNE und 2dDCB inkubiert und die Höhe der induzierten DNA-Schäden mit und ohne Butyratbehandlung miteinander verglichen. Die Ergebnisse zur 2dDCB-Inkubation von LT97 Adenomzellen nach Butyratbehandlung sind in der Abb. 37 dargestellt, die Ergebnisse der 4-HNE-Versuchsreihe können dem Anhang (Abb. 56) entnommen werden.

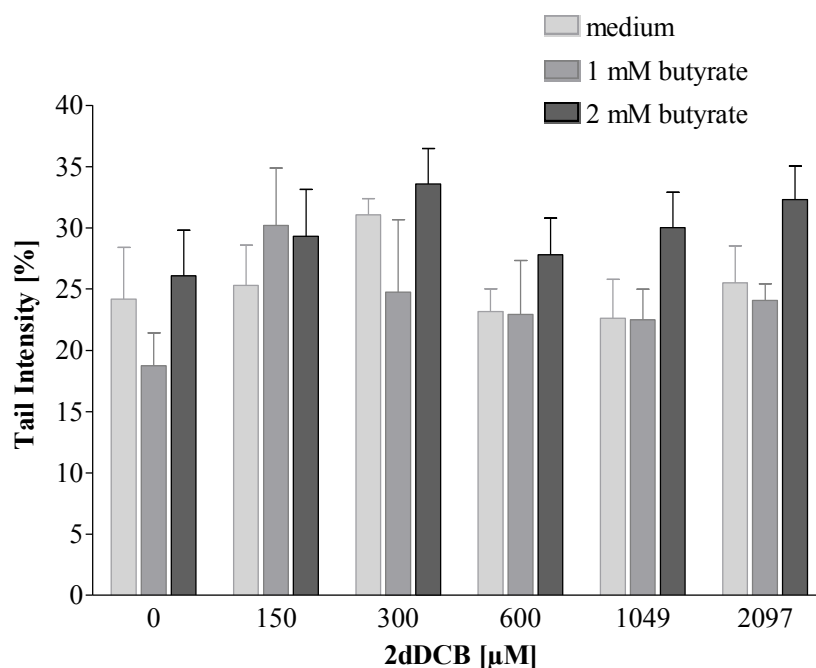


Abbildung 37: Induktion von DNA-Schäden im Comet Assay durch 2-Dodecylcyclobutanon nach Vorbehandlung der LT97 Adenomzellen mit Butyrat (1, 2 mM) für 24 Stunden [n=3]

Sowohl die Ergebnisse der Vorversuchsreihe mit 4-HNE (Anhang, Abb. 56) als auch die Daten der 2dDCB-Versuchsserie lieferten keine eindeutige Aussage zum Potenzial von Butyrat, die Adenomzellen vor 2dDCB induzierten DNA-Strangbrüchen zu schützen.

Insgesamt zeigten die basalen Schäden der LT97 Zellen ein ca. fünffach höheres Niveau als in den vorangegangenen Versuchen ohne Butyratvorbehandlung, in welchen bereits nachgewiesen werden konnte, dass durch 2dDCB signifikante Schäden gesetzt werden.

3.5. Untersuchung des klastogenen Potenzials von 2-Dodecylcyclobutanon mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die im Folgenden vorgestellten Arbeiten und Ergebnisse zur Untersuchung substanzinduzierter Chromosomenschäden ohne metabolische Aktivierung basieren auf einem an die OECD-Guidelines (OECD 473) angelehntes Versuchsprotokoll [145]. Als Positivkontrolle wurde Ethylmethansulphonat (EMS) in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt [145-146].

3.5.1. Umsetzung der OECD Richtlinie 473 zur Untersuchung der Mutagenität des 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen

Voruntersuchungen

Die Richtlinie 473 schreibt eine 6-stündige Behandlung proliferierender Säugerzellen mit der zu testenden Substanz vor, welche im Anschluss an die Behandlung einen weiteren Zellzyklus durchlaufen sollen. Dies gewährleistet, dass sich die nicht oder falsch reparierten DNA-Schäden in Form von Chromosomenmutationen manifestieren können, was mittels der 24-Farben-FISH Methode sichtbar gemacht werden kann. Im Vorversuch wurden zur Konzentrationsfindung die mit 2dDCB und den entsprechenden Kontrollen behandelten Zellen mit dem Trypanblau-Ausschlusstest nach eingehender morphologischer Betrachtung am Mikroskop hinsichtlich Vitalität untersucht.

Zytotoxizität der Testsubstanzen an proliferierenden LT97 Zellen - Konzentrationsfindung

Die ersten Ansätze verwendeten die bisher in den Zytotoxizitäts- und Genotoxizitätsstudien eingesetzten Konzentrationen des 2dDCB. Dabei wurde mit einem Lösungsmittelanteil von 4% EtOH gearbeitet. Dieser entsprach jedoch nicht den Kriterien der Richtlinie OECD 473 für die Mutagenitätstestung, welche niedrigere EtOH-Konzentrationen verlangte. Analog wurde auch EMS auf seine Wirksamkeit getestet, bevor 1 mM als nicht zytotoxische, aber in diesem Testsystem Chromosomenschäden-induzierende Konzentration festgelegt wurde.

2dDCB erwies sich als stark zytotoxisch in adhärent wachsenden Zellen. Schon 150 µM 2dDCB führten nach bereits 2 von insgesamt 6 Stunden Inkubation zur Ablösung der Zellen in Form eines „Zellteppichs“. Höhere Konzentrationen führten zu einem ähnlichen Ergebnis.

Diese Situation forderte zusätzlich zu den gegebenen Bedingungen der Richtlinie eine Veränderung und damit Anpassung der Versuchsbedingungen an das OECD-Protokoll.

Im Folgenden wurde zum einen die Ethanolkonzentration auf 0,1% verringert und zum anderen wurden 1-50 μM 2dDCB eingesetzt. Zunächst sollte auch hier die zeitabhängige Wirkung (6, 12, 24 Stunden) der Testsubstanzen auf die Zellvitalität und die Induktion von DNA-Schäden in proliferierenden Zellen nach 6 Stunden Inkubation Gegenstand der Untersuchungen sein. Die 6-stündige Behandlung mit 2dDCB bildet die Grundlage für den anschließenden Mutagenitätstest und sollte daher keine zytotoxischen Effekte auf die LT97 Zellen haben.

Wie in der Abb. 38 zu sehen, kam es unter den veränderten Versuchsbedingungen mit verringertem Ethanolanteil und geringeren Konzentrationen von 2dDCB zu keiner Beeinflussung der Zellen. Der Anteil der abgelösten Zellen betrug jeweils weniger als 10% der Gesamtzellzahl.

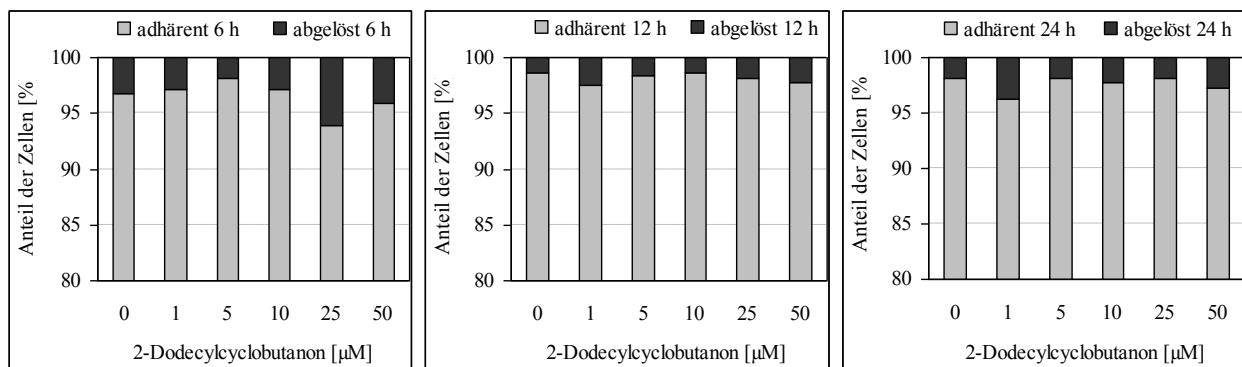


Abbildung 38: Prozentuale Anteile der abgelösten LT97 Zellen infolge der Inkubation mit 2dDCB nach 6, 12 und 24 Stunden [n=1]

Die folgenden Abbildungen (Abb. 39A und B) geben einen Überblick über die Vitalitäten der adhärennten und der abgelösten Zellpopulation

Unabhängig von der Konzentration verloren die im Überstand befindlichen Einzelzellen mit zunehmender Zeit an Vitalität. Im Gegensatz hierzu veränderte sich die Vitalität der adhärennten Zellen nicht. Sie betrug durchschnittlich 70%.

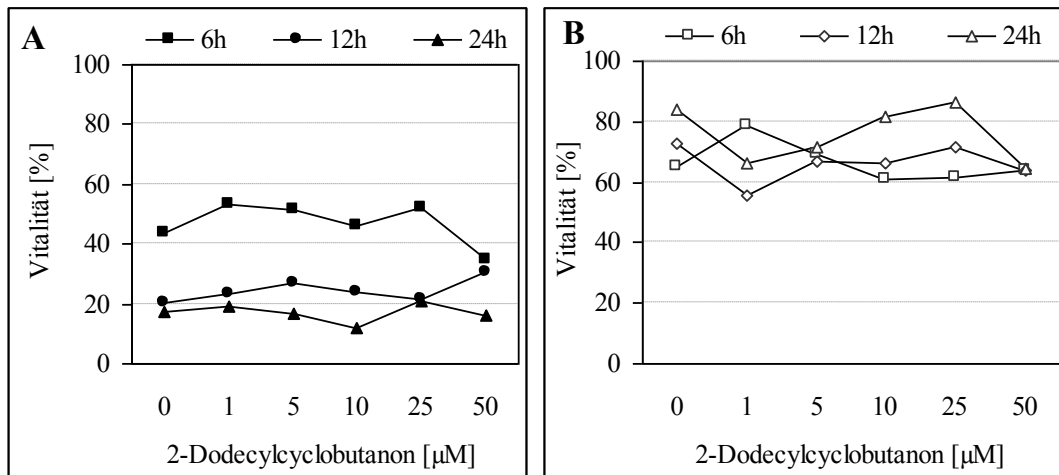


Abbildung 39: Vitalität der abgelösten (A) und der adhärenen (B) LT97 Adenomzellen nach Behandlung mit 2Dodecylcyclobutanon für 6, 12 und 24 Stunden [n=1]

Die Abb. 40 fasst die nach 6 Stunden in den adhärenen Zellen induzierten DNA-Schäden zusammen.

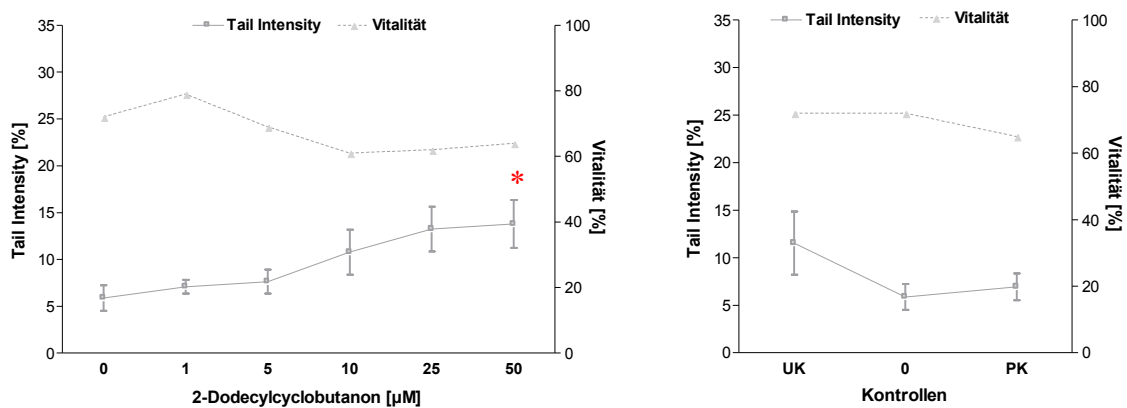


Abbildung 40: Induktion von DNA-Schäden in proliferierenden LT97 Adenomzellen nach 6 h 2dDCB [n=1; 1-50 µM]

Während die Positivkontrolle 4-HNE in einer Konzentration von 50 µM keine DNA-Strangbrüche setzte, waren nach 6 Stunden 50 µM 2dDCB signifikant höhere DNA-Schäden nachweisbar als in der Lösungsmittelkontrolle. Die Lösungsmittelkontrolle (0,1% EtOH) beeinflusste weder die Vitalität noch die DNA-Integrität. In einem weiteren Vorversuch wurden 3-fach höhere Konzentrationen nämlich 30, 75 und 150 µM mit einem daraus folgenden LM-Anteil von 0,3% für den Mutagenitätstest eingesetzt. Entsprechend wurden 150 µM der PK verwendet.

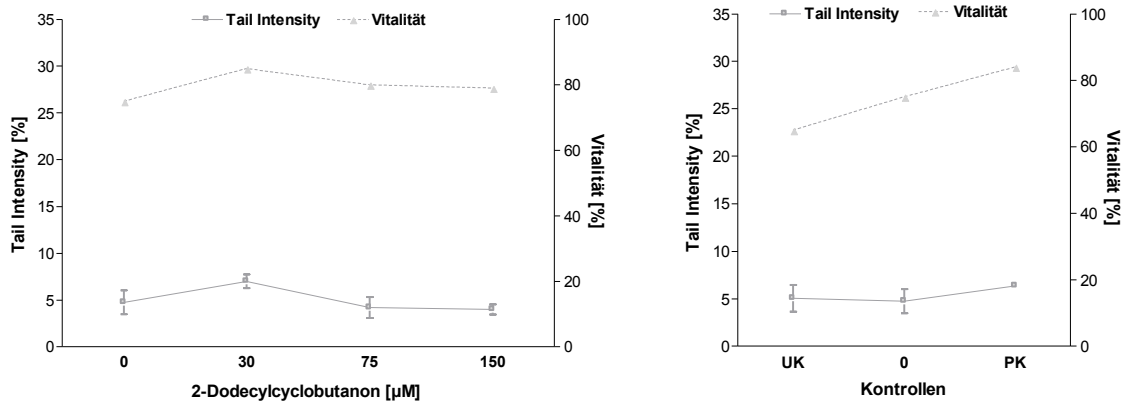


Abbildung 41: Induktion von DNA-Schäden in proliferierenden LT97 Adenomzellen nach 6 h 2dDCB
[n=1; 30-150 μM]

Im Gegensatz zum ersten Versuch zeigten die Ergebnisse zur Vitalität und DNA-Schädigung nach 6 Stunden (Abb. 41) keine DNA-Strangbrüche und auch keine Vitalitätsbeeinflussung durch höhere Konzentrationen von 2dDCB.

3.5.2. Induktion von Chromosomenaberrationen durch 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen (24-Farben-FISH-Analyse)

Nach 6-stündiger Inkubation der proliferierenden, subkonfluenten LT97 Zellen mit den Testsubstanzen und einem sich anschließenden Zellzyklus in frischem Kulturmedium wurden die Zellen durch Zugabe von Colcemid in der Metaphase arretiert und anschließend geerntet, die Metaphasen präpariert und zur Untersuchung zytogenetischer Veränderungen der FISH Analyse unterzogen.

Ethylmethansulphonat (EMS)

EMS induzierte in der nicht zytotoxischen Konzentration von 1 mM zahlreiche Chromosomenaberrationen in LT97 Zellen und erwies sich somit als geeignete Positivkontrolle für diesen Mutagenitätstest. Die 24-Farben-FISH Analyse der EMS-behandelten Zellen ermöglichte nach Auszählung von je 50 Metaphasekernen aus 2 voneinander unabhängigen Versuchen Aussagen zu spezifischen Chromosomenschäden (Abb. 42).

Im Mittel zeigten 82 % ($41 \pm 4,2$ von 50) der untersuchten Metaphasekerne Aberrationen. Insgesamt wurden $130 \pm 5,7$ Chromosomenbrüche gezählt, welche hauptsächlich zu Deletionen ($62,8 \pm 31,5\%$) und Translokationen ($25,0 \pm 16,3\%$) führten. Bezogen auf den Anteil aberranter Metaphasen fanden im Mittel $3,2 \pm 0,5$ chromosomale Brüche statt. Darüber hinaus traten vermehrt so genannte Markerchromosomen ($16,5 \pm 12,0$) auf. Nach ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) handelt es sich hierbei um strukturell abnorme

Chromosomen unbekannten Ursprungs, welche mittels zytogenetischer Methoden allein nicht charakterisierbar sind [152].

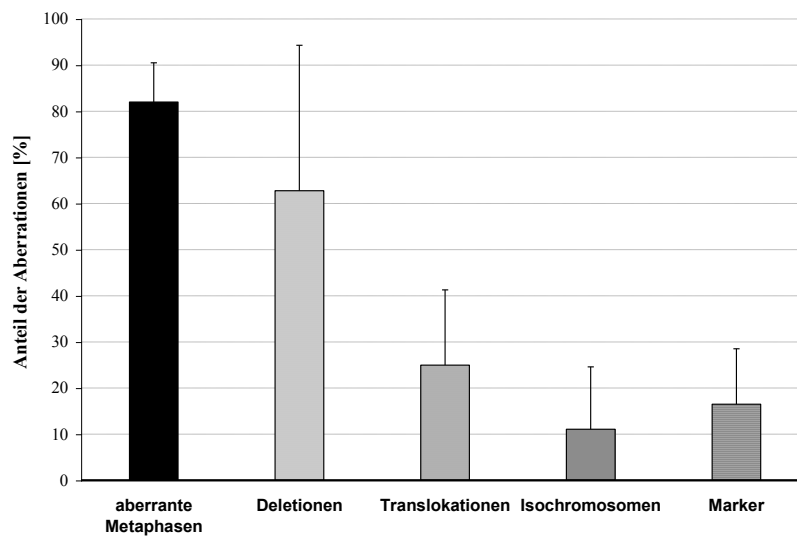


Abbildung 42: Mutationsspektrum von 1 mM EMS in LT97 Adenomzellen [n=2]

Bis auf die Chromosomen 1, 10, 12, 14, 16, 18 und X waren in beiden Versuchen alle anderen Chromosomen von einer Deletion betroffen. Ihr Anteil an der Gesamtbruchzahl lag jeweils bei $\geq 1\%$. Die Anzahl der Deletionen in den Chromosomen 3, 7, 17 war im Vergleich zu einer Inkubation der Zellen mit nur 0,5 mM EMS (n=1, nicht dargestellt) erhöht. Circa ein Viertel ($22,3 \pm 14,9\%$) der durch 1 mM EMS induzierten Deletionen konzentrierten sich in diesen Chromosomen. Ein Großteil ($41,8 \pm 12,6\%$) der durch EMS induzierten Translokationen war in den Chromosomen 1, 7, 12, 14, 15, 17, 18, 19 zu finden. Eine konzentrationsabhängige Zunahme der translozierten chromosomalen Anteile wurde nicht beobachtet. Eine ganzheitliche Betrachtung aller Metaphasen zeigte, dass in nahezu allen Chromosomen ungerichtete Translokationen stattfanden. Die Induktion von Isochromosomen beschränkte sich auf die Chromosomen 1, 13, 14 und 18, wobei keine Übereinstimmungen in beiden Experimenten zu finden waren.

Diese durch die Positivkontrolle induzierten Schäden können als Vergleichsbasis zu den durch 2dDCB induzierten Schäden eingesetzt werden.

2-Dodecylcyclobutanon

Die in Abb. 42 dargestellten Parameter aberrante Metaphasen, Deletionen, Translokationen und Isochromosomen sowie die Entstehung zusätzlicher Marker oder der selteneren Chromatidbrüche sollten als Basis für die Bewertung der durch 2dDCB induzierten Chromosomenveränderungen dienen. Stets wurden EMS (1 mM) als Vergleichskontrolle,

EtOH (0,3%) als Lösungsmittelkontrolle und 150 μ M 4-HNE als zweite Positivkontrolle mitgeführt. Die Abb. 43 gibt einen Einblick in die Bildanalyse der Metaphasen in Form von Karyogrammen. Als Beispiel ist je eine charakteristische Metaphase der 24-Farben FISH für die verschiedenen Testsubstanzen in der Falschfarben-Darstellung zu sehen, um einzelne mögliche Aberrationen zu veranschaulichen.

In der Darstellung handelt es sich um zufällig ausgewählte Beispiele, die nicht im Zusammenhang zueinander stehen.

SCHÄFERHENRICH ET AL. beschrieben eine für LT97 Zellen charakteristische Klonverteilung [128]. Einen dieser Zellklone zeigt das Karyogramm der Lösungsmittelkontrolle. Der Klon 2 ist gekennzeichnet durch ein verändertes (Iso)chromosom 1 mit einer Translokation vom Chromosom 18, wobei sich ein dicentrisches Chromosom der(1)dict(1;18) gebildet hat. Das derivative Chromosom 7 findet sich dagegen in jeder LT97 Zelle unabhängig einer Klonzugehörigkeit und ist ein Marker für eine konstitutive Veränderung der Zelllinie. Ein weiteres Charakteristikum dieses Zellklons ist die partielle Monosomie 18p durch die Translokation des 18q Arms an das Isochromosom 1, welche hier als -18 beschrieben wird (man kann hier auch von einer del(18p) sprechen). Zusätzliche chromosomale Aberrationen sind in dieser Metaphase nicht zu erkennen gewesen. Die Daten der einzelnen Karyogramme wurden gesammelt und in Form von Diagrammen zusammengefasst.

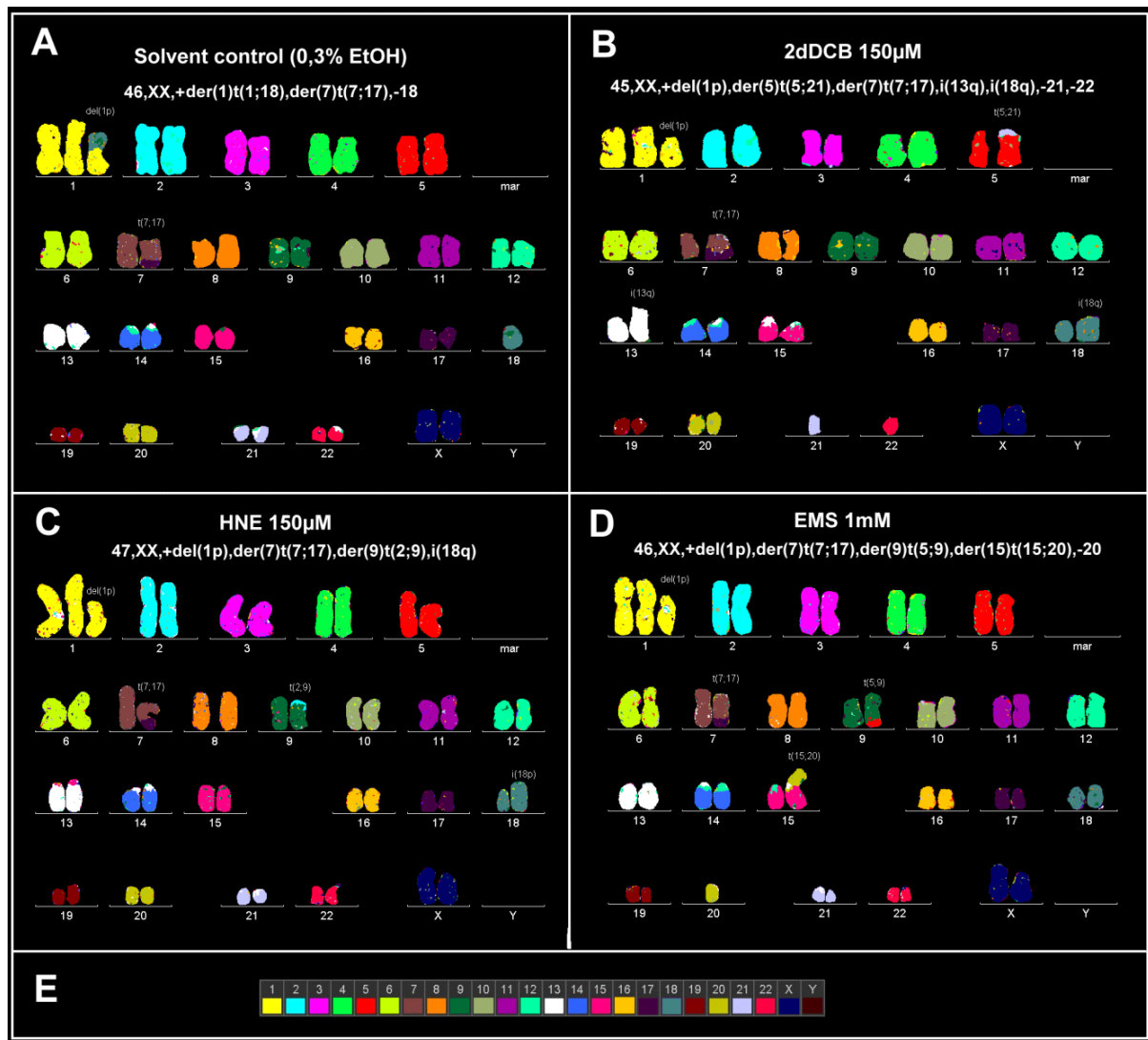


Abbildung 43: Typisches Ergebnis der 24-Farben-FISH Analyse bei LT97 Adenomzellen nach 6 Stunden Inkubation mit den Testsubstanzen

Im Teilbild E sind die verwendeten Pseudofarben für jedes Chromosom angegeben.

Abkürzungen: p=kurzer Arm eines akrozentrischen Chromosoms; h=Heterochromatin; del=Deletion.

Basierend auf der 24-Farben-FISH Technik beschreiben die folgenden Abbildungen (Abb. 44 bis 51) die durch 2dDCB induzierten chromosomalen Veränderungen in LT97 Adenomzellen. Die konstitutiven Aberrationen der Zelllinie, t(1;18), t(7;17), -18, del(1p), wurden nicht in die Auswertung einbezogen, sondern nur die zusätzlich aufgetretenen Veränderungen.

Je getesteter Konzentration wurden 50 Metaphasen ausgewertet. Die Art und Anzahl der aufgetretenen chromosomalen Veränderungen lässt auf die Gesamtzahl der Chromosomenbrüche schließen. So sind für das Entstehen einer bestimmten Aberration wie einem Isochromosom oder einer Translokation mindestens zwei Brüche notwendig. Eine Deletion oder ein Chromatidbruch benötigt jeweils mindestens einen Bruch.

Die Abb. 44A betrachtet die Anzahl der nach einer Behandlung mit 2dDCB aufgetretenen aberranten Metaphasekerne. Die Anzahl wird in Prozent als Anteil der Zellkerne mit

Aberrationen an den betrachteten 50 Metaphasen angegeben. In der Abb. 44B ist die Gesamtzahl der Chromosomenbrüche in den ausgewerteten 50 Metaphasen dargestellt. Die mittlere Anzahl der Brüche je aberranter Metaphase ist in der Abb. 44C gezeigt.

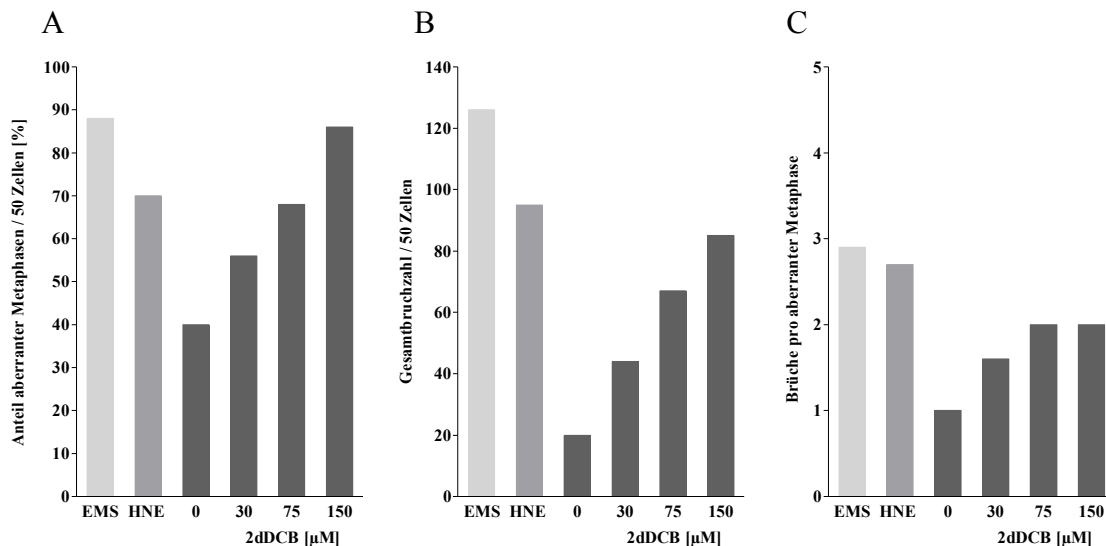


Abbildung 44: Induktion von aberranten Metaphasen (A) sowie Chromosomenbrüchen in 50 Zellen (B) bzw. in den aberranten Metaphasen (C) in LT97 Adenomzellen nach 6-stündiger Behandlung mit EMS (1mM), 4-HNE (150 µM) und 2-Dodecylcyclobutanon

Nach einer 6-stündigen Behandlung proliferierender LT97 Adenomzellen mit 150 µM 2dDCB traten in 86 % der ausgewerteten Metaphasekerne strukturelle chromosomale Veränderungen auf (Abb.51 A). Die Lösungsmittelkontrolle (0,3% EtOH) zeigte ebenfalls wie die hier nicht dargestellte Mediumkontrolle diverse chromosomale Umbauten, welche unspezifisch und zufällig auftraten und den „Hintergrund“ an Aberrationen bildeten. EMS zeigte die meisten Aberrationen und die höchste Anzahl an Chromosomenbrüchen, insgesamt 126. In der zweiten Positivkontrolle mit 4-HNE wurden 95 Brüche induziert. Für 2dDCB bestand ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang, so dass nach einer Behandlung der Zellen mit 30 µM 44 und nach 150 µM insgesamt 85 Brüche gezählt wurden. Im Mittel wurden je aberranter Metaphase 1 Bruch durch EtOH, 2 Brüche durch 150 µM 2dDCB und ca. 3 Brüche durch EMS verursacht.

Zur näheren Charakterisierung der Aberrationen wurde der Anteil der verschiedenen Chromosomenmutationen bestimmt. Die Abb. 45 zeigt das Spektrum der durch 2dDCB in LT97 Adenomzellen erzeugten Mutationen. Dabei wurden bei zunehmender Anzahl der Brüche mit steigender Konzentration überwiegend Aberrationen in Form von Deletionen und Isochromosomen induziert. Der prozentuale Anteil der Deletionen an den Gesamtbruchzahlen veränderte sich nicht (ca. 40%), so dass durch steigende Konzentrationen von 2dDCB vermehrt Chromosomenbrüche und somit in erster Linie die daraus resultierenden Deletionen

entstanden. Eine eindeutige Zunahme der Anzahl an Isochromosomen wurde nicht beobachtet. Diese entstanden im Mittel aus 35-55% aller induzierten Brüche.

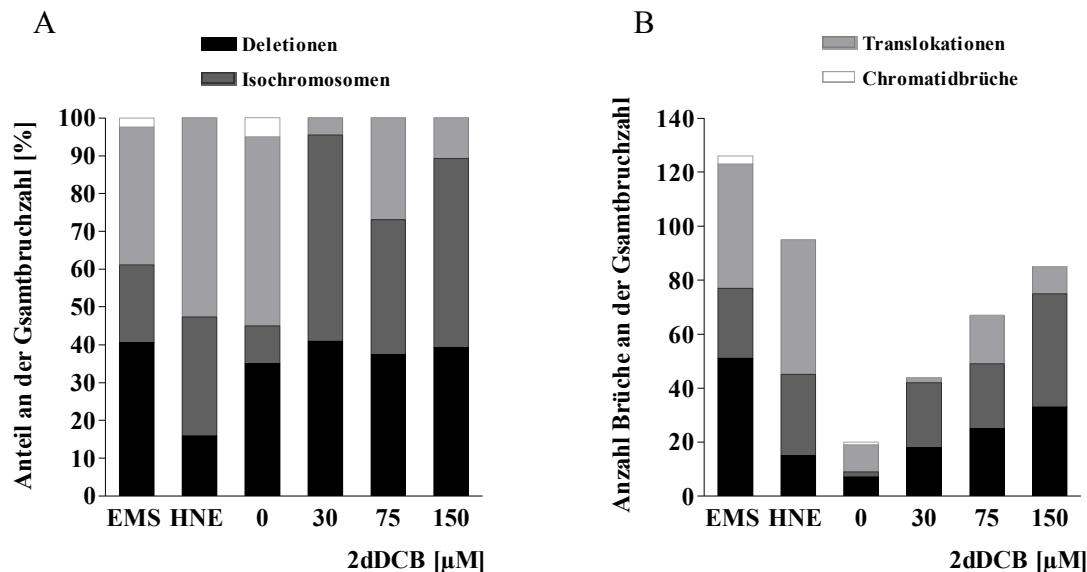


Abbildung 45: Mutationsspektrum von 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen: (A) Anteil der einzelnen Aberrationen an der Gesamtbruchzahl in % und (B) in Chromosomenbrüchen

Unabhängig von der Gesamtzahl an Chromosomenbrüchen unterschied sich das Spektrum der chromosomalen Veränderungen, welche durch 4-HNE induziert wurden, deutlich von dem des potenziellen Mutagens EMS und dem des 2dDCB. Während 4-HNE neben Translokationen hauptsächlich Isochromosomen verursachte, wurden nach einer Behandlung mit EMS deutlich mehr Deletionen gefunden.

Die als eine Folge direkter Schädigung von zellulärer DNA durch ein Agens bekannten Chromatidbrüche wurden nur in zwei Fällen beobachtet, auf eine weitere Auswertung wurde daher verzichtet.

Zur weiteren Spezifizierung der Effekte wurde geprüft, ob die für die KolonkrebSENTstehung und -progression relevanten Chromosomen 5, 12, 17 und 18 gezielt von einer Schädigung, ausgelöst durch 2dDCB, betroffen waren. Auf diesen sind das *APC*-Gen (adenomatous polyposis coli, 5q21-q22), das *KRAS*-Gen (kirsten rat sarcoma, 12p12.1), das *MCC*-Gen (mutated in colon cancer, 5q21-22), das *TP53*-Gen (tumour protein 53, 17p13.1) sowie das *SMAD2/SMAD4*- (18q21.1) bzw. das *DCC*-Gen (deleted in colorectal carcinoma, 18q21.3) lokalisiert [64-66, 153].

Die Ergebnisse der Auswertung sind in der Abb. 46 dargestellt.

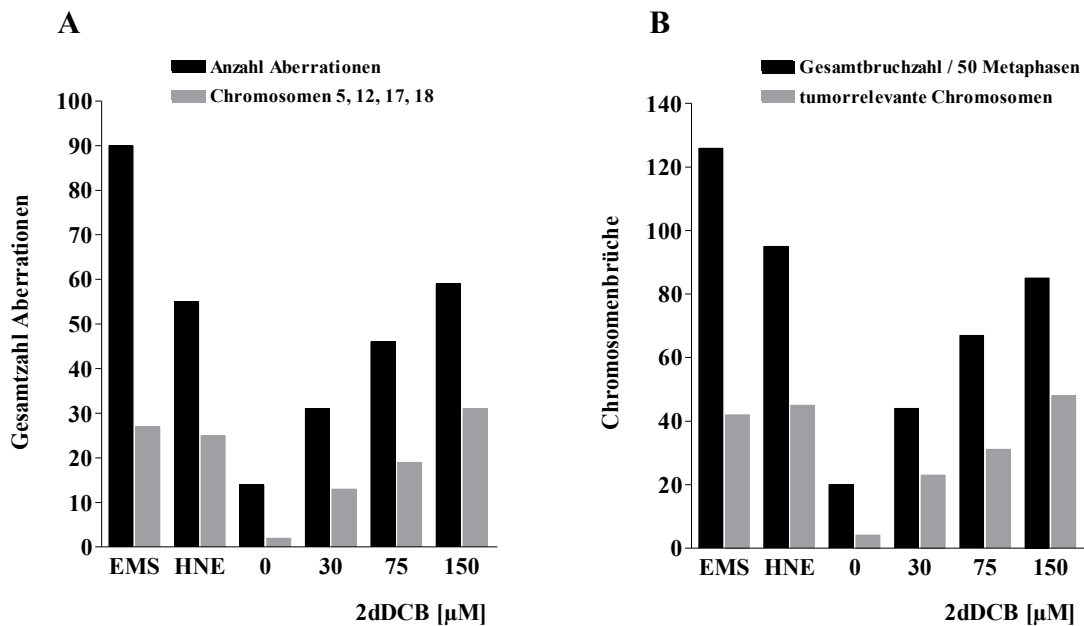


Abbildung 46: Anzahl der Brüche in den tumorrelevanten Chromosomen 5, 12, 17 und 18 im Vergleich zur Gesamtbruchzahl je 50 Metaphasen

Die Abb. 46 zeigt deutlich, dass es bei einer Exposition der Adenomzellen gegenüber der Kontrolle EMS, 4-HNE und 2dDCB im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu einer Schädigung der tumorrelevanten Chromosomen kam. Dabei nahm die Anzahl chromosomaler Veränderung in diesen Chromosomen mit steigender Konzentration von 2dDCB zu. Nach 30 µM 2dDCB traten 41,9 % aller chromosomaler Veränderungen in den tumorrelevanten Chromosomen auf, nach 150 µM sogar 52,5 %. In den mit den Positivkontrollen EMS und 4-HNE behandelten Zellen waren die Chromosomen 5, 12, 17 und 18 mit 30 bzw. 46 % ähnlich häufig betroffen. 2dDCB induzierte konzentrationsabhängig vor allem Isochromosomen, Deletionen und den Großteil der insgesamt in allen 50 Metaphasen detektierten Translokationen unter Beteiligung dieser 4 Chromosomen. Mit einer Häufigkeit von ca. 20% aller aufgetretenen Translokationen war in den Fällen der Positivkontrollen mindestens eines der vier genannten Chromosomen von dieser Art einer chromosomalen Veränderung betroffen. Isochromosomen gehörten auch zu den häufigsten durch EMS erzeugten Veränderungen. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Betrachtung der Zellen, welche mit 150 µM 4-HNE behandelt wurden. 100% der entstandenen Isochromosomen und 33% der Deletionen wurden in den Kolonkrebs relevanten Chromosomen beobachtet.

In den Zellen der EtOH-Kontrolle (0 µM) traten nur vereinzelt Chromosomenbrüche auf, welche nicht die tumorrelevanten Chromosomen 5, 12, 17 und 18 betrafen.

Die Betrachtung des einzelnen Chromosoms 5 zeigte eine Zunahme der Chromosomenschäden mit steigender 2dDCB Konzentration. Während sich nach 30 µM

2dDCB weder Deletionen noch Translokationen im betreffenden Chromosom ereigneten, nahm der prozentuale Anteil (an der Gesamtbruchzahl) von Deletionen und Translokationen induzierenden Brüchen im Chromosom 5 durch 2dDCB (75, 150 μ M) von 1,49 auf 9,42% zu. Im Chromosom 12 wurden nur geringe Veränderungen der Chromosomenstruktur detektiert, die sich auf das Auftreten von Translokationen (2% der Gesamtbruchzahl) nach 75 und 150 μ M 2dDCB beschränkten. Eine Zunahme der Translokationsereignisse wurde nicht beobachtet.

Die Analyse des in der LT97 Adenomzelllinie unveränderten Wildtyp Chromosoms 17 zeigte, dass ein bedeutender Anteil von ca. 9-12% aller durch 2dDCB induzierten Brüche bzw. Aberrationen dieses Chromosom trafen (Abb. 47). Wurden die Zellen steigenden Konzentrationen von 2dDCB ausgesetzt, traten Deletionen, welche speziell 17p betrafen, immer und insgesamt häufiger auf als Translokationen, welche nur nach 150 μ M 2dDCB zu beobachten waren.

Die Abb. 47 zeigt wie häufig das Chromosom 17 innerhalb der 50 ausgezählten Metaphasekerne von chromosomalen Schäden betroffen war.

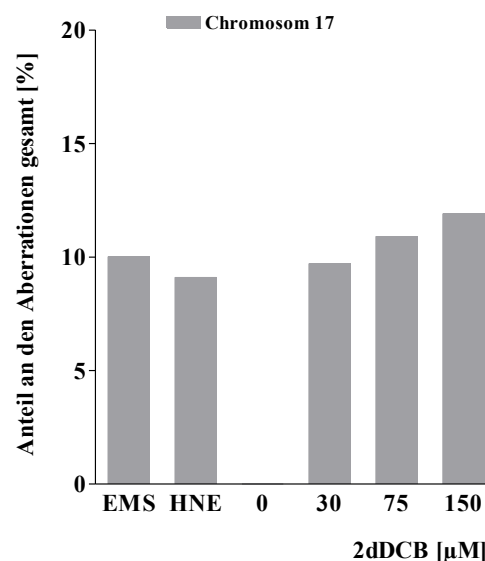


Abbildung 47: Prozentualer Anteil aller Chromosomenschäden (50 Metaphasen) im Chromosom 17 der Adenomzelllinie LT97 nach 1mM EMS, 150 μ M HNE, 0,3 % EtOH und 2-Dodecylcyclobutanon (30-150 μ M)

Im Vergleich zur EtOH-Kontrolle induzierten EMS, 4-HNE und 2dDCB in LT97 Adenomzellen Aberrationen im Chromosom 17. Im Fall von 2dDCB nahm die Anzahl der speziell im Chromosom 17 geschädigten Metaphasekerne konzentrationsabhängig zu. Es wurden bis zu 70% der in den tumorrelevanten Chromosomen detektierten Deletionen allein im Chromosom 17 beobachtet. Darüber hinaus war dieses Chromosom in 20% der durch 150 μ M vermittelten Translokationen involviert.

Auch das tumorrelevante Chromosom 18 war von einzelnen Mutationen betroffen. Dazu zählen Deletionen des 18p (bis 4,7% der Gesamtbruchzahl) und die Entstehung von Isochromosomen 18q (>30% der Gesamtbruchzahl), welche durch 2dDCB ausgelöst wurden und konzentrationsabhängig zunahmen. Den Effekt der Isochromosomenbildung zeigten auch die Positivkontrollen EMS und 4-HNE. Als ein weiterer Parameter wurde die Entstehung von Markerchromosomen festgehalten (Abb. 48).

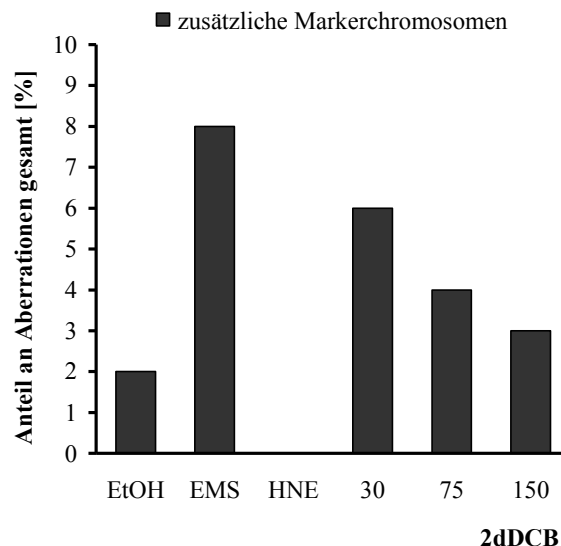


Abbildung 48: Entstehung zusätzlicher Markerchromosomen in Abhängigkeit von der Behandlung der LT97 Adenomzellen mit den Testsubstanzen in μM

Zusätzliche, nicht identifizierte Markerchromosomen unbekannten Ursprungs traten mit Ausnahme der mit 4-HNE behandelten LT97 Zellen sowohl in den Kontrollzellen als auch in den mit den Testsubstanzen inkubierten Zellen auf. In den mit EMS behandelten LT97 Zellen wurde die höchste Anzahl dieser heterogen zusammengesetzten Chromosomenstücke gefunden.

3.5.3. Induktion spezifischer Schäden im Tumorsuppressorgen *TP53* durch 2-Dodecylcyclobutanon in LT97 Adenomzellen (2-Farben-FISH-Analyse)

Die Untersuchung der tumorrelevanten Chromosomen hinsichtlich chromosomaler Schäden durch das 2dDCB zeigte, dass unter anderem auch Mutationen des 17p als Träger des *TP53* Allels als ein möglicher Endpunkt der Exposition von Kolonzellen gegenüber 2dDCB bestimmt werden konnte. Dabei stellte sich die wichtige Frage, ob 2dDCB außer Chromosomenmutationen auch direkte Schäden im Allel des *TP53* induzierte, auch wenn das Chromosom selbst strukturell intakt erscheint. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die 2-Farben-FISH-Technik eingesetzt. Hierbei wurde zum einen der kurze Arm des Chromosoms 17 durch eine partial chromosome painting (pcp)-Sonde und zum anderen der auf diesem 17p-

Arm lokalisierte Genabschnitt des *TP53* über eine lokusspezifische (LSI-) Sonde sichtbar gemacht. Für die Beurteilung der genspezifischen Schäden wurden die Proben, die zuvor für die 24-Farben-FISH-Analyse verwendet wurden erneut als Metaphasen auf Objektträger aufgebracht und der FISH unterzogen. Anschließend wurden mindestens 50 aussagekräftige Metaphasen mittels Photoimaging hinsichtlich des betreffenden Genabschnittes ausgewertet (Abb.49).

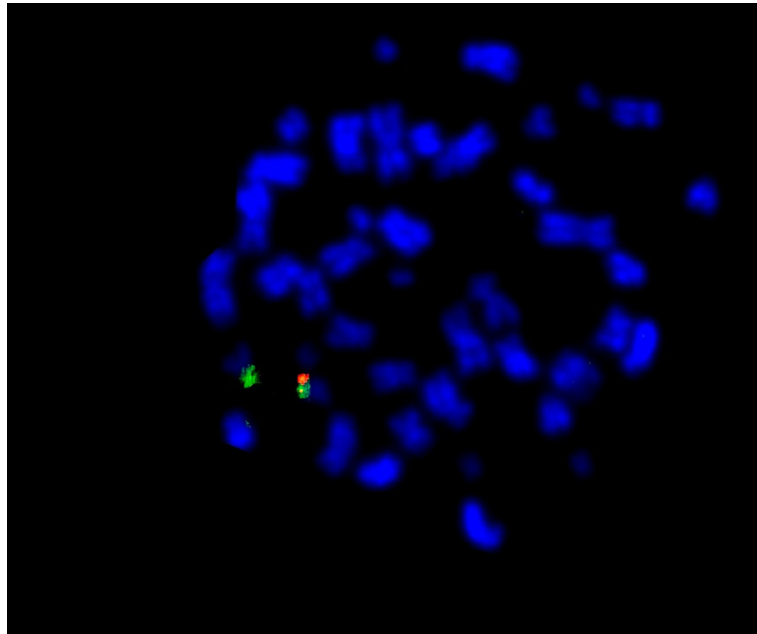


Abbildung 49: Metaphasenaufnahmen: Gesamt-DNA (DAPI), 17p-Arm (FITC), TP53 (SpectrumOrange); del(17p13)

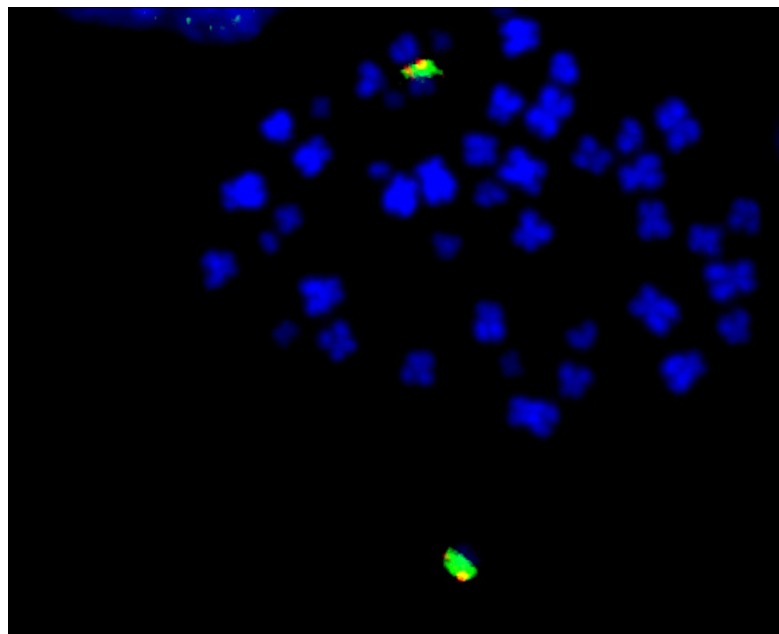


Abbildung 50: Metaphasenaufnahmen: Gesamt-DNA (DAPI), 17p-Arm (FITC), TP53 (SpectrumOrange); 4 Signale für ein normales TP53

Die Farbaufnahmen zeigen zwei Metaphasen der LT97 Adenomzelllinie mit del(17p13) in Abb. 49, das heißt einer kompletten Deletion des TP53 auf einem der beiden 17er Chromosomen und in Abb. 50 einen hinsichtlich des TP53 Gens unveränderten Metaphasekern mit je zwei Signalen je Chromosom.

Für die Metaphaseauswertung wurden Veränderungen wie Duplikationen (>4 Signale) Translokationen (balanciert/unbalanciert; ≥ 4 Signale), Deletionen eines Allels (cht del(17p13)) und die Deletion beider Allele (del(17p13)) eines Chromosoms erfasst. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der beobachteten Ereignisse an der Gesamtzahl der Metaphasen (Mutationsspektrum) der Abb. 51 zu entnehmen.

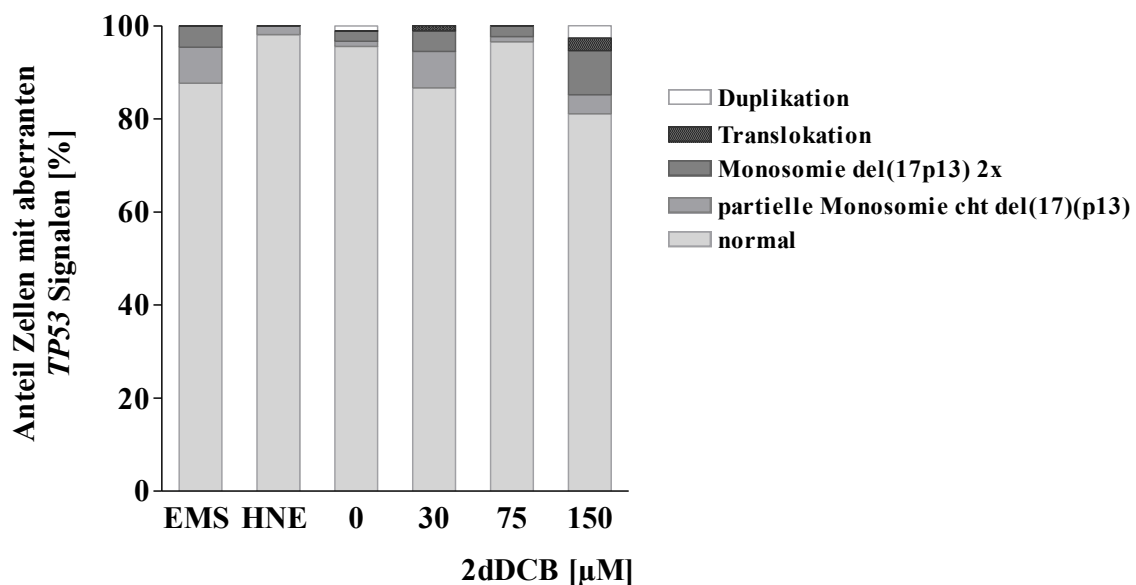


Abbildung 51: Mutationsspektrum des *TP53* in der Tochtergeneration der mit den Testsubstanzen behandelten LT97 Adenomzellen

Es ist festzuhalten, dass 2dDCB eine Bandbreite verschiedener Mutationen im *TP53*-Genlocus induzierte, wobei keine Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisbar war. Nachweislich erzeugten 150 µM 2dDCB in ca. 19 % der untersuchten Metaphasen Aberrationen, welche hauptsächlich als Deletion eines *TP53*-Allels auf dem replizierten Chromosomenarm (Tochterchromatide, cht del(17)(p13); 3 Signale für *TP53*) oder als Deletion im betreffenden Genabschnitt auf der mütterlichen Chromatide (2 Signale) beschrieben werden konnten. Im ersten Fall würden als Folge dieser Veränderungen eine gesunde Tochterzelle und eine Tochterzelle mit einer partiellen Monosomie im 17p13 entstehen. Im zweiten Fall wären beide Tochterzellen partiell monosom für 17p13. Translokationen dieses Genabschnitts traten insgesamt sehr selten und nur in den 2dDCB behandelten LT97 Zellen auf. Eine Duplikation des 17p13 wurde sporadisch auch in der Lösungsmittelkontrolle beobachtet.

4. DISKUSSION

Eine Vielzahl von Studien konnte die Bildung von 2-Alkylcyclobutanonen (2ACB) in den verschiedensten fetthaltigen Lebensmitteln wie Geflügel-, Schweine- und Rindfleisch, aber auch in Käse und Obst nachweisen [154-156]. Dabei steigt die Konzentration der gebildeten 2ACB linear zur eingesetzten Strahlendosis an und ist abhängig von den in den Lebensmitteln vorkommenden Fettsäuren [40, 157-159]. *GADGIL ET AL.* verbesserten die Methode der Superkritischen Flüssigkeitsextraktion (SFE) um 2ACB zu extrahieren und zu isolieren. Über Gaschromatographie und Massenspektroskopie erfolgte die Quantifizierung der 2ACB. 2-Dodecylcyclobutanon (2dDCB), welches aufgrund des häufigen Vorkommens der Vorläuferfettsäure Palmitinsäure ein Hauptvertreter der Klasse der 2ACB ist, konnte in allen bestrahlten Proben detektiert und der lineare Zusammenhang der Konzentrationen mit der Strahlendosis bestätigt werden [28].

In frischem Rinderhackfleisch beträgt der Anteil an Palmitinsäure ca. 25% am Gesamtfettgehalt. Ein linearer Anstieg der Konzentration von 2dDCB in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis wurde auch im Hackfleisch mehrfach nachgewiesen [28, 39-40, 157-158]. Umgekehrt ist es demnach möglich anhand der Bestimmung des 2dDCB die ursprünglich eingesetzte Strahlendosis zu berechnen [160] und so die Bestrahlung eines Lebensmittels nachzuverfolgen. Dabei scheint der Gesamtfettgehalt des Lebensmittels keinen wesentlichen Einfluss auf die gebildete Menge von 2dDCB zu haben, was sich bei der Berechnung der absorbierten Strahlendosen in kommerziellen Fleischwaren mit einem variierenden Fettanteil als Vorteil erweist [160].

Für Hackfleisch wurde eine 2dDCB-Konzentration von 0.03 ± 0.01 ppm ($n=3$) bestimmt. Eine Hackfleischportion von ca. 110 g enthält demnach 3,3 µg (14 nmol) 2dDCB [23], eine Konzentration, die 50000-fach geringer ist als die in der vorliegenden Arbeit *in vitro* getesteten Konzentrationen mit positiven Effekten und welche damit zu gering ist um *in vivo* toxische Effekte auszuüben.

Üblicherweise werden toxikologische Studien mit erhöhten Konzentrationen der Testsubstanzen durchgeführt. Darüber hinaus kann ein Sicherheitsfaktor eingesetzt bzw. muss bei genotoxischen oder mutagenen Wirkungen eine Minimierung stattfinden und eine Sicherheitsbewertung durchgeführt werden [23]. Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) empfiehlt, dass indirekte Lebensmittelzusätze, welche in Mengen größer als 1,5 µg pro Tag konsumiert werden, auf ihre Sicherheit getestet werden [161-162]. Eine bestrahlte Hackfleischportion von 125 g übersteigt diesen Grenzwert bereits für 2dDCB und rechtfertigt daher Sicherheitsuntersuchungen hinsichtlich Genotoxizität und Mutagenität. In Abhängigkeit

vom Fettsäurespektrum des Fleisches können im Mittel sogar bis zu 80 µg der 2ACB aufgenommen werden [23].

Die Sicherheitsfrage ist vor allem in den Vereinigten Staaten ein Schwerpunkt, da bestrahltes Hackfleisch einen großen Anteil an der nationalen Schulverpflegung ausmacht [163].

Neben erblichen Faktoren gilt auch das Vorkommen genotoxischer Verbindungen in Lebensmitteln als Risikofaktor für Kolorektalkrebs [100], welcher nach wie vor eine der Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen darstellt. Einige dieser Verbindungen entstehen während der Verarbeitung von Lebensmitteln, wie zum Beispiel heterozyklische aromatische Amine (HAA), Nitroverbindungen (NOC) und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) [164-165]. Vertreter dieser drei Klassen an Nahrungsmittelkontaminanten gelten als potenzielle Genotoxine in bakteriellen und Säugerzellsystemen und zeigten im Tierversuch karzinogene Effekte [166-167]. Hieraus ergaben sich Fragen hinsichtlich der Sicherheit von Lebensmitteln, welche nachweislich HAA, NOC und PAK enthalten, und deren Einfluss auf die Gesundheit der Verbraucher. Jedoch ist, wie für das Beispiel der HAA berichtet wurde [168], die Beurteilung der toxikologischen Relevanz einer dauerhaften Exposition gegenüber Lebensmittelmutagenen und das daraus resultierende Krebsrisiko trotz umfassender Bestimmungen von Risikofaktoren ungewiss [169-170].

Ob die Klasse der 2-Alkylcyclobutanone, speziell das 2dDCB, welches im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen stand, als potenzielle Genotoxine betrachtet werden können, soll basierend auf den wichtigsten Ergebnissen und entsprechend den Zielsetzungen der Arbeit nachfolgend diskutiert werden.

Übergreifend ist festzuhalten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungsansätze zur molekulartoxikologischen Beurteilung von 2-Alkylcyclobutanonen in humanen Dickdarmepithelzellen nicht nur Hypothesen früherer Studien bestätigen, sondern erstmalig auch eine Vielzahl neuer Wirkungspotenziale dieser Verbindungen aufzeigen.

4.1. Cyclobutanonverbindungen wirken in präneoplastischen und primären Kolonzellen nach akuter Exposition toxisch

Ob es sich bei 2ACB um toxische Verbindungen handelt wird in verschiedenen Studien widersprüchlich diskutiert. Im bakteriellen Toxizitätsassay mit *Vibrio fischeri* Zellen, einem Screening Test, konnten durch GADGIL ET AL. keine akut-toxischen Effekte durch das radiolytische Palmitinsäurederivat 2dDCB nachgewiesen werden [44]. Vielmehr wurde die Toxizität zwischen der von Cyclohexanon und 2-Nonenal eingestuft und somit das Risiko,

welches von 2dDCB ausgeht, als sehr gering beurteilt. Die effektive Wirkkonzentration lag hier bei 7,2 ppm. In der INTERREG II Studie wurden toxikologische Effekte durch 2ACB in Bakterien nachgewiesen. Die aus verschiedenen Untersuchungen zum Wachstum von *Salmonella typhimurium* TA 97 hervorgegangenen Ergebnisse zeigten, dass einige 2ACB zytotoxische Wirkungen besitzen. Weiterhin ließen sie vermuten, dass die Toxizität mit der Länge der Alkylkette assoziiert sein könnte, da in der Mehrzahl der Tests das kurzkettige radiolytische Myristinsäurederivat 2-Decylcyclobutanon (2DCB) im Vergleich zu 2dDCB eine um das 10-Fache erhöhte Wirkungsstärke zeigte [23].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der akuten Zytotoxizität der gut etablierte und zuverlässige Trypanblau-Ausschlusstest verwendet. Sein Anwendungsspektrum umfasst nicht nur die Detektion von Zellen mit veränderter Membranpermeabilität, sondern auch von Zellen verschiedener Formen und Größen mit unebenen Membranen und nukleärer Kondensation. Im ersten Fall können vorwiegend nekrotische Zellen mikroskopisch sichtbar gemacht werden, weshalb er häufig als Kurzzeit-Viabilitätsassay eingesetzt wird. Im zweiten Fall gelten diese Kriterien dem Nachweis apoptotischer Zellen. Weiterhin findet dieser Test auch Anwendung als Referenztestsystem für andere, neue Färbemethoden [171].

In eigenen Untersuchungen mit dem Trypanblau-Ausschlusstest nach 30, 60, 90 und 120 min Behandlung mit den Cyclobutanonverbindungen konnte in den Kolontumorzellen HT29clone19A keine akute Toxizität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den bestehenden Daten von *GADGIL ET AL.* überein [44]. Jedoch zeigten *DELINCÈE ET AL.* in der INTERREG II Studie, dass 2dDCB, 2tDCB, γ -Stearolacton und 2tDeCB, letzteres in *cis*- und *trans*-Konfiguration und als Mix, bei längeren Expositionszeiten von bis zu 48 Stunden toxische Wirkungen auf die humanen Kolontumorzellen HT29 und HT29clone19A ausübten, indem sie den zellulären Stoffwechsel negativ beeinflussen [23, 42]. Als Parameter der Toxizität wurde hier die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen vitaler Zellen als Endpunkt verwendet. So wurden die Aktivitäten der intrazellulären Enzyme des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien (MTT-Test) sowie die Aktivität der Enzyme auf der Oberfläche der Plasmamembran (WST 1-Test) bestimmt [172]. Im Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten lagen die effektiven Konzentrationen im unteren Bereich der in eigenen Untersuchungen verwendeten Konzentrationen im Trypanblau-Ausschlusstest. Darüber hinaus zeigt eine bisher unveröffentlichte Untersuchung von *SOMMERS* auch in TK6 Lymphoblasten nach Anwendung des Mikrokerntests negative Effekte

von 2dDCB auf die Überlebensrate der Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit Dosen von 53 bis 106 μM [173].

Die Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen an den eigentlichen Zielzellen der Karzinogenese, den gesunden primären und den primär-ähnlichen Kolonepithelzellen, verweisen zum ersten Mal auf ein starkes Wirkpotenzial der 2ACB in diesen, so dass deutliche Effekte auf die Viabilität der Zellsysteme bereits nach akuter Exposition innerhalb von 30 bis 120 min beobachtet werden konnten. Hierbei zeigte 2dDCB in den primären humanen Kolonepithelzellen die stärkste Wirkung. Eine signifikante Zellschädigung trat bereits innerhalb von 30 min bei Konzentrationen $\geq 300 \mu\text{M}$ auf ($66,8 \pm 5,7$ % vitale Zellen, $p < 0.01$), wobei anzumerken ist, dass im Gegensatz zu den übrigen Versuchsreihen auch das Lösungsmittel Ethanol (4%) nach 90 und 120 min zytotoxische Effekte verursachte. Dies kann einerseits an der eingesetzten hohen Konzentration gelegen haben, andererseits können auch interindividuelle Empfindlichkeiten die Ursache für Abweichungen dieser Art sein, da es sich bei den hier verwendeten humanen Donorgeweben um heterogenes biologisches Material handelt. In der statistischen Analyse ergaben die um den Ethanoleffekt bereinigten Daten, dass nicht nur die Zeit, sondern auch die Konzentration einen signifikanten Effekt auf das Überleben der Zellen hatte. In primären Kolonzellen wurden als effektive Wirkkonzentrationen (EC_{50}) nach 90 min 157 μM und nach 120 min 93 μM 2dDCB errechnet. Die Effekte des 2tDCB, 2tDeCB und des 4tDBL waren insgesamt weniger stark ausgeprägt und zeigten für 2tDCB und 4tDBL keinen deutlichen Dosis-Wirkungszusammenhang. Für 2DeCB wurde nach 120 min eine EC_{50} von 213 μM bestimmt. Die in LT97 Adenomzellen nachgewiesenen Effekte zeigten ein ähnliches Muster wie jene, die in den primären Kolonzellen gefundenen wurden. So verursachte eine Behandlung der Zellen mit 2tDCB oder mit 4tDBL zytotoxische Effekte ohne deutliche Hinweise auf eine dosisabhängige Toxizität, wohingegen 2dDCB wiederum stärker und mit zunehmender Konzentration die Zellvitalität beeinflusste als 2tDeCB. Die EC_{50} -Werte lagen hier nach 90 min bei 589 μM bzw. bei 221 μM nach 120 min für 2dDCB. 2tDeCB wies nach 120 min eine EC_{50} von 409 μM auf.

Die *in vitro* innerhalb von 60 min nach Gabe von 2dDCB und 2tDeCB auftretende akut-toxischen Wirkung in Form von irreversiblen Membranschäden, die zum Zelltod führen, kann als ein möglicher, in diesem Fall *nicht-genotoxischer Mechanismus* angesehen werden, der über sekundäre Effekte im Prozess der Kanzerogenese eine Rolle spielt. Zytotoxizität gilt als

ein charakteristischer Effekt so genannter *nicht-genotoxischer Kanzerogene* (siehe auch Abschnitt DNA-Schäden und Einstufung als Kanzerogen) und wird *in vivo* als ein möglicher Auslöser für eine gesteigerte Proliferation bzw. Induktion einer regenerativen Hyperplasie diskutiert [174]. Diese Annahme basiert auf der Erkenntnis, dass einige zytotoxisch wirkende chemische Verbindungen, welche nicht mit der DNA interagieren, im selben Organ, in dem sich nach einer Langzeitexposition der Tumor entwickelt, regenerative Hyperplasie auslösen können [175-176].

Übertragen auf eine mögliche *in vivo*-Situation, in welcher es durch chronische Zellschädigung durch Zytotoxizität zu einer Erhöhung der Absterberate der Zellen eines Organs oder Gewebes kommt, wird das betroffene Gewebe angeregt den entstandenen Schaden zu reparieren und es reagiert mit einer verstärkten Zellreplikation, einer möglichen Ursache für Hyperplasie [177]. Damit im Zusammenhang steht die erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass sich endogene promutagene DNA-Läsionen (z. B. Addukte) in Mutationen manifestieren [178]. Hintergrund für das mutagene Potenzial der Mitogenese ist zum einen ein verkürztes Zeitintervall zwischen den Zellteilungen und damit einhergehend eine eingeschränkte DNA-Reparatur. Zum anderen ist die während der Zellteilungsphase einzelsträngige DNA ohne Basenpaarung und Histone um ein Vielfaches sensitiver gegenüber Schädigungen als doppelsträngige DNA einer ruhenden Zelle [179]. Eine stärkere Vermehrung initiiert Zellen ist die Folge. So können chemische Verbindungen, welche die Zellproliferation erhöhen, mutagen und in der Konsequenz karzinogen wirken.

Zusammenfassend betrachtet war das Cyclobutanon 2dDCB mit der kürzesten Alkylkette in Ringposition 2 am stärksten zytotoxisch. Dies bestärkt die Hypothese der Autoren der INTERREG II Studie, dass die Länge der Seitenketten einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität der 2ACB hat [23]. In diesem Zusammenhang gilt es zu erwähnen, dass sich diese Hypothese wiederfindet, wenn man die Toxizität einzelner Fettsäuren, welche als Vorläuferfettsäuren für Cyclobutanonverbindungen dienen, vergleichend betrachtet.

Eine Vielzahl von Studien an verschiedenen Krebszelllinien beschreibt eine positive Korrelation der gefundenen toxischen Effekte wie Apoptose und sekundäre Nekrose mit Zunahme der Kettenlänge und einem geringen Sättigungsgrad der Fettsäuren [180-183]. In normalen primären Zellen allerdings wird ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Toxizität und Kettenlänge sowie Sättigungsgrad postuliert. Palmitinsäure (PS) wird *in vitro* als starker Induktor von oxidativen DNA-Schäden, DNA-Strangbrüchen, Zellmembranschäden, Apoptose und Nekrose unter anderem in primären humanen

Fibroblasten und Pankreas β -Zellen sowie in Melanomzellen der Maus beschrieben [184-186]. Zellspezifisch zeigt PS im Vergleich zu längerkettigen Fettsäuren wie Arachidon- und Linolsäure unter anderem die stärksten Effekte bezüglich Zytotoxizität und DNA-fragmentierender Eigenschaften [184]. *MU ET AL.* zeigten in ihrer Studie mit humanen ovariellen Granulosa-Zellen deutlich die gegensätzlichen Wirkungsspektren von gesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Im Konzentrationsbereich von 100-300 μ M wiesen die Autoren apoptotische Effekte von Palmitin- und Stearinsäure zum einen über den Weg der Suppression des Apoptose-Hemmers Bcl-2 und zum anderen über die Induktion des Apoptose-Effektors Bax nach. Nicht-toxische Arachidonsäurekonzentrationen von bis zu 15 μ M, zeigten jedoch antagonistische Wirkungen und damit einen signifikanten protektiven Effekt auf den Palmitin- oder Stearinsäure-induzierten Zelltod [187].

Die gezeigten Ergebnisse zur Zytotoxizität sind in der Ernährung des Menschen von geringer toxikologischer Relevanz, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass die hier eingesetzten Konzentrationen durch eine herkömmliche, ausgewogenen Ernährung mit mäßigem Konsum von bestrahltem Fleisch erreicht werden können.

4.2. Cyclobutanonverbindungen induzieren in präneoplastischen und primären Kolonzellen DNA-Schäden - Relevanz der Ergebnisse für die Kolonkarzinogenese

Der Versuchsansatz zum Nachweis von DNA-Schäden mit Hilfe des Comet Assay wurde so gewählt, dass ein Vergleich mit früheren Ergebnissen und Angaben aus der Literatur möglich wurde.

4.2.1. Cyclobutanonverbindungen sind nicht genotoxisch in differenzierten Kolontumorzellen

In ersten Untersuchungen von *DELINCÈE ET AL.* im Rahmen der INTERREG II Studie zeigten die untersuchten 2ACB bis zu einer Konzentration von 400 μ M (ca. 100 μ g/ml) in HT29 und HT29clone19A Zellen keine genotoxischen Effekte [23, 42]. Auch die Testung höherer Konzentrationen von 300-1250 μ g 2ACB/ml in früheren Studien von *DELINCÈE UND POOL-ZOBEL* zeigte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Genotoxizität [33].

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Konzentrationsbereich von 150-2097 μ M (0,036-0,5 mg/ml) an humanen Kolontumorzellen (HT29clone19A), an primär-ähnlichen LT97 Adenomzellen sowie an frisch isolierten primären Zellen des humanen Kolons getestet. In HT29clone19A Zellen konnte ausschließlich für 2dDCB in der höchsten getesteten

Konzentration von 2097 μM nach einer 30-minütigen Behandlung eine marginale, aber signifikante DNA-schädigende Wirkung ($6,96 \pm 0,86\%$ TI) nachgewiesen werden. Eine dosisabhängige Wirkung war nicht zu erkennen, was die Ergebnisse von *DELINCÉE ET AL.* bestätigt [23, 42].

Somit induzieren 2ACB in Tumorzellen des Kolonepithels offenbar keine weiteren DNA-Schäden.

4.2.2. Cyclobutanonverbindungen induzieren zeit- und konzentrationsabhängig DNA-Schäden in Adenomzellen

DELINCÉE UND POOL-ZOBEL konnten 1998 zeigen, dass 2dDCB, welches als Leitsubstanz für 2ACB verwendet wurde, in *in vitro*-Untersuchungen mit primären Kolonzellen der Ratte und mit Zellen aus Humanbiopsien sowohl zytotoxisch als auch genotoxisch ist [33]. In einer darauf folgenden Studie wurden *in vivo*-Experimente mit Ratten durchgeführt, welche verschiedene Konzentrationen von 2dDCB per Schlundsonde erhielten und anschließend auf DNA-Schäden in isolierten Kolonepithelzellen untersucht wurden. Geringe, aber signifikant erhöhte DNA-Schäden zeigten nur die Kolonzellen solcher Versuchstiere, welche die höhere Dosis von 14,9 mg/kg Körpergewicht verabreicht bekommen hatten [188].

Diese frühen Ergebnisse deuten an, dass die Cyclobutanonverbindungen vor allem in nicht-malignen Zellen DNA-Schäden induzieren können.

Die neuen, eigenen Daten zur zeit- und konzentrationsabhängigen Induktion von 2dDCB-vermittelten DNA-Schäden in LT97 Zellen unterstützen diese Hypothese [142]. Signifikante DNA-Schäden traten besonders bei 2dDCB und 2tDeCB bereits im unteren Konzentrationsbereich von 300 bzw. 150 μM auf und nahmen bis einschließlich 1049 μM zu. Insgesamt zeigten jedoch die Zellen, welche mit 2tDCB oder 2tDeCB behandelt wurden höhere DNA-Schäden als 2dDCB-behandelte Adenomzellen. Nach Behandlung mit der höchsten Konzentration (2097 μM) war in allen Fällen ein Rückgang der DNA-Strangbrüche zu detektieren. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Löslichkeitsgrenze der 2ACB mit 0,5 mg/ml Kulturüberstand bei einem Ethanolanteil von 4% wahrscheinlich grenzwertig überschritten wurde und es so zur Präzipitatbildung kam, welche durch eine leichte Eintrübung des Kulturmediums nach Zugabe der 2ACB-Stammlösung zu erkennen war. Dieser Effekt wurde in nahezu allen Versuchsreihen mit LT97 und primären Zellen nach Zugabe der 2ACB beobachtet. Nach Zugabe des Laktons, dessen Löslichkeitsgrenze bekannt war, trat der Effekt nicht auf. Die oben genannten Beobachtungen wurden in den Ansätzen mit geringeren Konzentrationen (75-1049 μM) von 2dDCB bei einem Ethanolgehalt von 2% im Kulturmedium (Abb. 24) nicht gemacht.

Ob die Zeit einen Einfluss auf die Höhe der entstandenen DNA-Schäden hat konnte abschließend nicht eindeutig geklärt werden. Die Ergebnisse für 2dDCB und 2tDCB in LT97 Zellen deuten jedoch darauf hin, dass eine Verstärkung der Effekte mit Zunahme der Zeit nicht auszuschließen ist. Für 2tDeCB- und 4tDBL-vermittelte Effekte besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zur Dosis.

4.2.3. Erhöhte Genotoxizität von 2-Dodecylcyclobutanon in primären Kolonozyten

Ausgehend von vergleichbaren Basis-DNA-Schäden waren im Vergleich zu LT97 Zellen die genotoxischen Effekte des 2dDCB in primären Kolonzellen über den gesamten Konzentrationsbereich stärker ausgeprägt und es bestand ein Trend zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Schäden bis einschließlich 1049 μM . Danach zeigte sich, wie bereits in der LT97 Versuchsreihe beobachtet, wiederholt ein Rückgang der messbaren DNA-Schäden.

Während 2tDeCB in Adenomzellen die stärksten Effekte zeigte, bestand in primären, frisch isolierten Kolonzellen eine starke Sensitivität gegenüber 2dDCB. Bereits nach Exposition gegenüber geringen Dosen wie 150 und 300 μM waren die DNA-Strangbruch-Raten signifikant erhöht. Das Wirkpotenzial von 2tDCB, 2tDeCB und 4tDCB war in primären Zellen im Vergleich zu LT97 Zellen schwächer.

Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass *in vitro* nicht zytotoxische Konzentrationen des 2dDCB in humanen Kolonzellen zu signifikanten DNA-Schäden führen. Hingegen konnten *DELINCÉE ET AL.* in ihrer ersten Studie an Ratten- und humanen Kolonzellen DNA-Schäden nur in Zusammenhang mit zytotoxischen Effekten in beiden Zellsystemen zeigen. Dabei reagierten die Humanzellen wesentlich sensibler als die Rattenzellen und die Überlebensrate lag nach Behandlung mit der höchsten Konzentration (1,25 mg/ml) deutlich unter 50% [189]. Bereits 0,3 mg 2dDCB/ml verursachten eine starke Abnahme der Zellviabilität, welche mittels des Trypanblau-Ausschlusstests bestimmt wurde. Hier zeigten sich auch speziesspezifische Unterschiede, da die Rattenkolonzellen wesentlich höhere Vitalitätsraten aufwiesen.

Eine Überprüfung ob die Zeit einen Effekt auf das genotoxische Wirkpotenzial hat, indem die Expositionszeit beider Zellsysteme von 30 auf 60 min verlängert wurde, war nur für 2tDCB, 2tDeCB und für 4tDBL sinnvoll, da 2dDCB bereits nach 30 min zytotoxisch wirkte. Doch im Vergleich zur Zytotoxizität konnte ein Einfluss der Zeit auf die DNA-Integrität nicht eindeutig bestätigt werden. Interessanter ist jedoch, dass unter den gegebenen Bedingungen nur die 4tDBL-behandelten Zellen nach 60 min gegenüber den 30 min erhöhte DNA-Schäden

aufwiesen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur bisher vermuteten und zum Teil bestärkten Annahme zum Einfluss der Kettenlänge an Ringposition 2.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass die Länge der Alkylkette von wesentlicher Bedeutung für die Toxizität der 2ACB in humanen Kolonepithelzellen ist [23]. 2dDCB, welches bei Bestrahlung aus der Vorläuferfettsäure Palmitinsäure entsteht, hatte in LT97 Adenomzellen und in primären Kolonzellen die stärkste zytotoxische und genotoxische Wirkung.

4.3. Metabolismus der Cyclobutanonverbindungen – Bedeutung des Glutathion-/Glutathion S-Transferase-Systems

Bisher ist nur sehr wenig über den Stoffwechsel der 2ACB bekannt und es gibt keinen Hinweis darauf, welches Enzymsystem bei der Umsetzung von Bedeutung sein könnte. Jedoch ist die Frage nach der Biotransformation ein wichtiger Punkt bei der Beurteilung der Toxizität dieser Substanzgruppe.

Der dieser Arbeit zu Grunde liegende Ansatz beschäftigte sich mit dem Glutathion-/Glutathion S-Transferasesystem (GSH/GST-System) im Allgemeinen und mit dem Glutathion-Status im Speziellen. Fremdstoffe (z. B. Toxine, chemische Karzinogene) unterliegen im Organismus meist einer metabolischen Umsetzung. Nach der Aktivierung durch Phase I-Enzyme kommt den Glutathion S-Transferasen in der Phase II der Biotransformation, aber auch der direkten Umsetzung von Fremdstoffen mit Glutathion eine große Bedeutung als zellulärer Schutz vor oxidativem Stress und toxischen Fremdstoffen zu. [190]. Da bereits am Beispiel des Fettsäuremetaboliten 4-HNE erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die Modulation (Hemmung oder Induktion) des GSH/GST-Systems zu einer Zu- bzw. einer Abnahme der Genotoxizität von 4-HNE in Kolontumorzellen führte, wurde die Rolle des Enzymsystems bei der Metabolisierung der 2ACB untersucht [135, 191].

Hierfür wurden unter Verwendung von 2dDCB als Hauptvertreter der Cyclobutanonverbindungen in Lebensmitteln drei Fragestellungen verfolgt. Schützt ein hoher Gehalt an intrazellulärem reduzierten GSH Kolontumorzellen vor Cyclobutanon-induzierten DNA-Schäden? (1)

Unterliegen Cyclobutanonverbindungen in Kolontumorzellen einer Konjugation mit GSH, welche als Abnahme des reduzierten GSH messbar wird? (2).

Und schützt eine Erhöhung der GST-Gesamtaktivität die Adenomzellen vor Cyclobutanon-induzierten DNA-Schäden? (3)

4.3.1. Einfluss des Glutathion-/Glutathion S-Transferase-Systems auf Cyclobutanon-induzierte DNA-Schäden

Um den Einfluss des GSH-Status auf die Genotoxizität der 2ACB (1) zu untersuchen, wurden HT29clone19A Zellen für 18 Stunden mit dem synthetischen Aminosäureanalogon Buthionin-(S,R)-sulfoximin (100 μ M) inkubiert, wodurch die GSH *de novo* Synthese gehemmt und der GSH-Gehalt der Zellen auf 25% des Ausgangsgehaltes reduziert wurde [135]. Anschließend wurden die Zellen mit ausgewählten 2ACB behandelt und im Comet Assay auf DNA-Schäden untersucht.

Die Inhibierung der γ -Glutamylcystein Synthetase durch BSO blockiert die Wiederherstellung des oxidierten GSH nach dessen Export aus der Zelle [192]. Dabei bindet der S-Alkyl-Anteil des Sulfoximins in der Region des aktiven Zentrums in der eigentlich die Bindung der Akzeptoraminosäure stattfindet. Die Inhibierung der γ -Glutamylcystein Synthetase ist mit einer Phosphorylierung des Sulfoximins und der daraus folgenden starken Bindung des Sulfoximin-Phosphatderivates an diese assoziiert [143]. In Studien mit humanen Tumorzelllinien wurde nachgewiesen, dass nach Induktion eines zellulären GSH-Mangels durch BSO die Sensitivität der Zellen gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika und Strahlung erhöht war [193-194]. Nach TERRADEZ ET AL. kann in 24-48 h, unabhängig von der Zellzahl, *in vivo* mit BSO (≥ 4 mM) eine maximale Reduktion des GSH-Ausgangsgehaltes um 85% im Tumorgewebe erreicht werden. Nach MADESH ET AL. ist eine Reduktion des GSH-Gehaltes um 90% *in vitro* (HT29) möglich, wenn für 72 h mit 0,1 mM BSO behandelt wird [195-196]. Proliferationsbeeinflussende Effekte durch BSO in Kolontumorzelllinien sind nicht bekannt [191].

In der vorliegenden Arbeit wurden BSO-behandelte HT29clone19A Zellen mit einem auf ca. 25% reduzierten GSH-Gehalt von 3,1 nmol/ 10^6 Zellen (entspricht dem Status von primär-ähnlichen und primären Kolonzellen) für 30 min gegenüber 2dDCB, 2tDCB und 2tDeCB in ansteigenden Konzentrationen exponiert und in den Comet Assay eingebracht. Eine Zunahme der DNA-Schäden infolge des verminderten intrazellulären GSH-Pools wurde dabei jedoch nicht beobachtet. Dies lässt zunächst vermuten, dass GSH als Kofaktor der GST-Enzyme keine Bedeutung in der Biotransformation der 2ACB hat. Ein verringerter GSH-Gehalt scheint somit nicht zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber der 2ACB beizutragen.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden HT29clone19A Zellen für 30 und 60 min mit 2dDCB inkubiert und im Anschluss erfolgte die Bestimmung des Gehaltes an intrazellulärem reduzierten GSH (2). Diese Untersuchung basierte auf der Erkenntnis, dass 4-HNE, welches hier auch als Positivkontrolle eingesetzt wurde, durch eine spontan oder über GST-vermittelte

Konjugation mit GSH entgiftet wird. Dies zeigt sich in einer Reduktion des GSH-Spiegels, welche messbar ist und bereits an HT29 Zellen gezeigt werden konnte [197-199]. Die GSTA4-4 ist als Hauptenzym der 4-HNE Metabolisierung bekannt. Jedoch wird sie in der parentalen HT29 Zelllinie nur marginal exprimiert, was auf eine hohe spontane Reaktionsrate zwischen 4-HNE und GSH hinweist [135, 200]. Des Weiteren wird die Entgiftungskapazität der GSTA4-4 für HNE aufgrund des einsetzenden Produkthemmungsmechanismus schnell erreicht. In Folge der unzureichenden Konjugation von 4-HNE mit GSH kommt es zur Reaktion von 4-HNE mit den zellulären Makromolekülen und führt zu den bekannten zytotoxischen und genotoxischen Effekten, wie Inhibition der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese sowie zu strukturellen DNA und Proteinschäden und Zellzyklusarrest [201].

Auch 2dDCB in der genotoxischen Konzentration von 2097 μM reduzierte nach 30 min den intrazellulären GSH-Spiegel der HT29clone19A Zellen signifikant. Eine Metabolisierung des Cyclobutanons selbst oder eines möglichen, bisher noch nicht nachgewiesenen Phase I-Metaboliten durch das Glutathionsystem kann demnach nicht vollständig ausgeschlossen werden. Festzuhalten ist, dass es in GSH-reichen Zellen (HT29clone19A) nach einer 30-minütigen Inkubation mit 2dDCB zu einer geringen, aber signifikanten Abnahme des Tripeptids kam. Es ist anzunehmen, dass die Konjugation mit Glutathion nicht wesentlich zur Entgiftung von 2dDCB beiträgt und wahrscheinlich als ein Nebeneffekt der Behandlung mit der Testsubstanz zu bewerten ist.

4.3.2. Modulation des Glutathion S-Transferase-Systems durch Butyrat - Auswirkungen auf Cyclobutanon-induzierte DNA-Schäden

Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich mit der Fragestellung ob Butyrat in der Lage ist, in primär-ähnlichen Adenomzellen des Kolons die GST-Gesamtaktivität zu induzieren und somit protektiv gegenüber Cyclobutanon-induzierten DNA-Schäden wirken kann (3).

Butyrat, einem Hauptenergieträger und Wachstumsstimulator in gesunder Kolonmukosa, werden in neoplastischen Kolonepithelzellen verschiedene chemoprotektive Effekte wie die Hemmung der Proliferation sowie apoptose- und differenzierungsfördernde Eigenschaften *in vitro* zugesprochen [108, 151]. EBERT ET AL. konnten die Induktion der GST in HT29 Zellen und in primären humanen Kolonfibroblasten durch 4 mM Butyrat nach 72 Stunden zeigen [150-151].

In den eigenen Untersuchungen war Butyrat im Challenge-Assay für 24 Stunden Bestandteil des Kulturmediums der LT97 Adenomzellen. In diesen führte Butyrat nachweislich zu einer Steigerung der GST-Gesamtaktivität. Im Anschluss an die Butyratbehandlung erfolgte die

Inkubation der Zellen mit 2dDCB für 30 min im Comet Assay. Entgegen der erwarteten protektiven Effekte gegenüber 2dDCB zeigten sich vermehrt DNA-Schäden in den mit Butyrat behandelten Zellen. Dieser Effekt wurde auch in anderen Versuchsreihen nach einer Inkubation von LT97 Zellen mit Butyrat beobachtet und bedarf einer Erklärung [202].

Freie Fettsäuren spielen eine bedeutende Rolle im Kontrollmechanismus der Proliferation und Apoptose von Zellen [203]. So steht neben der Modulation von Differenzierung und Zellzyklusarrest durch Butyrat besonders die Apoptose und hier speziell die butyratgesteuerte Kontrolle von Transkription, Expression und Aktivität von Schlüsselproteinen in der Apoptosekaskade im Mittelpunkt der Diskussionen um mögliche Mechanismen der Hemmung von frühen und späten Ereignissen in der Tumorigenese [204-208]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Butyrat auch direkt in die Regulation der Caspasenexpression und -aktivität eingreift, einem der wichtigsten regulatorischen Schritte im Apoptosesignalweg [209-212]. Dabei werden zellspezifisch bzw. in Abhängigkeit der Tumorart verschiedene Signalwege aktiviert [209]. Wie bereits für physiologische Gehalte von Palmitin- und Stearinsäure beschrieben beeinflusst auch Butyrat in physiologischen Konzentrationen von 5 und 10 mmol/l die Expressionslevel anti- und proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie. *AVIVI-GREEN ET AL.* berichten von einem starken Shift zu proapoptotischen Proteinen, d.h. zu einer Hochregulation von Bak und einer gleichzeitigen verminderten Bcl-2-Expression [209]. Ähnliches konnte auch für HT29 und für Caco-2 Zellen beobachtet werden, wobei die Bcl-2 Expression unverändert blieb [213-214].

Zum einen konnten spätere laboreigene Untersuchungen zeigen, dass Butyrat ab einer Konzentration von 2 mM in der Kolonadenomzelllinie LT97 Apoptose induziert, wobei eine signifikante Aktivitätssteigerung für PARP und die Caspasen 2, 3, und 8 sowie der Caspase 9 nachgewiesen wurde [202, unveröffentlichte Daten *SCHARLAU ET AL.*].

Andere laboreigene Studien befassten sich mit der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in LT97 Zellen. Das von *SPANGE* gefundene Expressionsmuster zeigt eine verstärkte Expression von $\text{TNF}\alpha$ während die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Expression zeitgleich vermindert war [202]. Beim Tumor-Nekrose-Faktor α ($\text{TNF}\alpha$) handelt es sich um ein Zytokin, welches über die Bindung an TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) sowohl pro- als auch antiapoptotischen Effekte auslösen kann [215]. Führt die Bindung von $\text{TNF}\alpha$ zu einer Interaktion von TNF-Rezeptor-assoziiierter death domain (TRADD) mit Fas-assoziiierter (FADD) und Zytokinrezeptor-assoziiierter death domain (CRADD) erfolgt die proteolytische Spaltung von Procaspase 8. Die darauf folgende Aktivierung der Caspase-Kaskade setzt die Apoptose

irreversibel in Gang. Die Aktivierung des nukleären Faktors NF κ B infolge der Bindung von TNF α an TNFR1 und dessen direkte Zusammenlagerung mit TRADD und TNFR-assoziiertem Faktor 2 (TRF-2) würde zur Transkription antiapoptotischer Gene (u. a. TNF, Interleukine, Adhäsionsmoleküle) führen. Die Beobachtung schließt die Aktivierung des nukleären Faktors κ B aber aus und damit dessen Translokation in den Kern, wo die Transkription antiapoptotischer Gene erfolgt. Die Ergebnisse von *POOL-ZOBEL ET AL.* unterstützen demnach die Hypothese einer proapoptotischen Rolle von TNF α in LT97 Adenomzellen nach Behandlung der Zellen mit 2 mM Butyrat für 24 h.

4.4. Nachweis des klastogenen Potenzials von 2-Dodecylcyclobutanon in präneoplastischen Kolonzellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die Klastogenität eines 2ACB in Zielzellen der Karzinogenese zu untersuchen. Als Vertreter für die 2ACB wurde 2dDCB ausgewählt und dessen klastogene Eigenschaften in der primär-ähnlichen LT97 Adenomzelllinie untersucht, da eine Langzeit-Kultivierung der isolierten, einzelnen Primärzellen über 12 Stunden nur mit geringen Vitalitäten möglich ist [216]. Isolierte Primärzellen lassen sich demnach nur über einen kurzen Zeitraum von 12 Stunden in Kultur bringen, weshalb sie nicht die für eine Mutagenitätstestung erforderlichen Voraussetzungen erfüllen.

Im Comet Assay zeigte 2dDCB zwar in den LT97 Zellen ein geringeres DNA-schädigendes Wirkpotenzial als 2tDCB und 2tDeCB, in gesunden Primärzellen jedoch wirkte 2dDCB im Vergleich am stärksten und hat daher die größte Relevanz.

Neben der Untersuchung von DNA-schädigenden Effekten lagen bisher keine Daten zu einem möglichen mutagenen Potenzial der Verbindungen, speziell des 2dDCB, in Säugerzellen vor. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen angewandten und von internationalen regulatorischen Behörden anerkannten validierten bakteriellen Kurzzeit-Genotoxizitätstests wie der Salmonella Mutagenitätstest (AMES Test) mit fünf verschiedenen Stämmen und externer metabolischer Aktivierung sowie der *Escherichia coli* Tryptophan Reverse Mutation Assay (TRP Assay) erbrachten keine positiven Ergebnisse [44-46, 217-218]. Die hierbei eingesetzten Dosen von 0,05-1 mg/Platte waren vergleichbar mit den effektiven Dosen in der vorliegenden Arbeit [44-45]. Basierend auf diesen Daten wird zum einen die Induktion von Punkt- oder Leserastermutationen in *Salmonella spp.* und zum anderen eine Aktivierung der Verbindung über mikrosomale Rattenleberenzyme ausgeschlossen.

Mit Hilfe der 24-Farben-FISH-Technik in Kombination mit der OECD-Richtlinie 473 zur Testung der Mutagenität in Säugerzellen wurde ein neues Modell zur Untersuchung zytogenetischer Läsionen, in welchem erstmals humane präneoplastische Kolonzellen verwendet wurden, erarbeitet. Die 24-Farben-FISH war für diese Untersuchungen sehr vorteilhaft, denn sie erlaubt die sofortige Sichtbarmachung und Identifizierung von komplexen chromosomalen Umbauten in Chromosomenpräparationen von Tumorzellen, welche oft nur qualitativ schlechte Metaphasen liefern und somit für die konventionellen zytogenetischen Techniken nicht zugänglich sind [219]. Zur Analyse von Genen und Chromosomen wird die FISH aufgrund ihrer absoluten Sensitivität und der Informationsfindung auf der Einzelgen- und Einzelzellebene als sehr aussagekräftig beurteilt, weshalb sie sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Anwendung in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat [220].

Allgemein ist das Auftreten von Chromosomenaberrationen unabhängig von der Art der induzierten Mutationen mit humanen Krebsformen assoziiert [221]. In den präneoplastischen Kolonadenomzellen induzierte 2dDCB eine Reihe von chromosomalen Umbauten, welche konzentrationsabhängig zunahmen. Zu einem großen Anteil (52%) waren die Chromosomen 5, 12, 17 und 18 von diesen strukturellen Veränderungen betroffen. Diese Chromosomen tragen die Gene *APC*, *KRAS*, *TP53* und *SMAD2/4*, welche in der kolorektalen Tumorentstehung von besonderer Relevanz sind, da sie häufig genetischen Veränderungen unterliegen. Zytogenetische und molekulargenetische Studien verweisen auf ein relativ klar definiertes Muster genetischer Umordnungen in Tumorzellen [222-223]. So betreffen die am häufigsten auftretenden chromosomalen Aberrationen im Fall kolorektaler Karzinome die Chromosomen 1, 7, 8, 13, 17, 18 und 20. Schäden in diesen Chromosomen resultieren in einem Verlust der Chromosomenarme 1p, 8p, 13p, 17p und des Chromosoms 18 sowie in einem Zugewinn an 1q, 7, 8q, 13q und 17q [223].

Mit dem hier erarbeiteten Ansatz konnten eindeutige Nachweise für das klastogene Potenzial von 2dDCB erbracht werden. Diese untermauern die bisher mit dem Comet Assay erzielten Kenntnisse zur Genotoxizität dieser Verbindung in Primärgewebe und verweisen auf die Mutagenität des Cyclobutanons.

Im Mittel wurden je aberranter Metaphase 1 Bruch durch EtOH (0,4%), 2 Brüche durch die höchsten getesteten 2dDCB Konzentrationen (75, 150 μ M) und ca. 3 Brüche durch EMS (1 mM) verursacht. Dies zeigt eindeutig, dass geringe Konzentrationen von 2dDCB, welche sich in Kurzzeitstudien als nicht-zytotoxisch und nicht-genotoxisch erwiesen hatten, in der Lage

sind, die DNA auf chromosomaler Ebene zu schädigen. Damit beschreibt die vorliegende Arbeit erstmals ein klastogenes Potential des 2dDCB.

4.5. 2-Dodecylcyclobutanon induziert Mutationen im TP53 präneoplastischer Kolonadenomzellen

Einen messbaren Effekt hatte 2dDCB auch auf die Integrität des Genabschnitts 17p13, welcher für das Tumorsuppressorprotein TP53 codiert. In ca. 20% der ausgewerteten Metaphasen konnten Veränderungen in diesem Gen beobachtet werden, wenn die Zellen mit 150 µM 2dDCB behandelt wurden und sich anschließend teilten. Neben *P53* auf 17p gehört auch das Tumorsuppressorgen *Deleted in Colon Cancer* (DCC), welches auf 18q lokalisiert ist, zu den häufig veränderten chromosomalen Regionen. Diese Gene unterliegen einem hohen Risiko einer Inaktivierung durch Mutationen.

Diese Erkenntnis über gezielte Veränderungen im Erbgut, speziell im *P53* präneoplastischer Kolonzellen, durch 2dDCB könnte eine Erklärung für die von *RAUL ET AL.* in einem experimentellen Rattenmodell zur Kolonkarzinogenese gefundene Promotorwirkung der Cyclobutanone 2tDCB und 2tDeCB sein [43]. Mit Hilfe dieses Modells wurde nach einer Azoxymethan-vermittelten Induktion von präneoplastischen Läsionen im Kolon der Ratten und einem drei- bzw. sechsmonatigem Verzehr von täglich 1,6 mg 2tDCB oder 2tDeCB ein signifikanter Anstieg der Gesamtzahl an aberranten Crypt Foci im distalen Kolon der 2tDeCB-behandelten Ratten gefunden. Mit der 2-Farben-FISH konnten hauptsächlich Deletionen eines TP53-Allels auf dem replizierten Chromosomenarm (Tochterchromatide, cht del(17)(p13) und Deletionen des Allels im betreffenden Genabschnitt der mütterlichen Chromatide nachgewiesen werden. Nach *BAKER ET AL.* finden sich in Abhängigkeit vom Tumor verschiedene Mutationen des *TP53*. Dabei treten Missense-Mutationen mit 80% am häufigsten auf. Deletionsmutationen, wie sie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurden, machen zusammen mit den ebenfalls vorkommenden Insertions- und Spleißmutationen ca. 12,5 % der möglichen *TP53*-Mutationen aus.

4.5.1. Ethylmethansulphonat als Positivkontrolle

Ein weiterer neuer Aspekt der Untersuchungen war der Nachweis von Chromosomenaberrationen in EMS-behandelten humanen Kolonozyten. EMS findet in verschiedenen Mutagenitätstests als Positivkontrolle Verwendung und ist dafür bekannt, randomisierte Punktmutationen oder Schwesterchromatidaustausche sowie Mikrokerne zu erzeugen [224]. Das Auftreten und die Manifestation von DNA-Schädigungen dieser Form bedürfen einer zweimaligen Replikation der Zellen [225-226]. Mit Hilfe der 24-Farben-FISH

Technik konnte jedoch ein weiterer Effekt von EMS auf das genetische Material beobachtet werden. Bereits 1,5 Zellzyklen nach Exposition der LT97 Adenomzellen gegenüber nicht zytotoxischen Konzentrationen von EMS waren strukturelle Chromosomenveränderungen detektierbar. Dabei trat kein spezifisches Muster an Aberrationen auf, d.h. EMS induzierte in dem hier verwendeten Zellsystem ungerichtete chromosomale Schäden, welche sich wiederholt hauptsächlich als Deletionen unter Beteiligung verschiedener Chromosomen präsentierten [146].

4.5.2. Einordnung der 2-Akylcyclobutanone als karzinogene Verbindungen

Der Mechanismus der Induktion von malignen Tumoren durch chemische Verbindungen lässt sich in vier Phasen einteilen. Die erste Phase nach einer Exposition von Säugerzellen gegenüber einem chemischen Karzinogen beinhaltet den **Transport** der Verbindung vom Ort des Eintritts in den Organismus, wo gegebenenfalls eine **metabolische Aktivierung** der Substanz erfolgt. In der zweiten Phase kommt es zur Interaktion des Moleküls mit den **zellulären Ziel-Molekülen**, wie zum Beispiel mit der DNA. Die in der dritten Phase auftretende **karzinogene Läsion** als Folge des induzierten DNA-Schadens, ist im Zusammenspiel mit der Proliferation in der vierten Phase wiederum die Grundlage der **Progression** durch verschiedene modifizierende Faktoren.

Jedoch gibt es karzinogene Verbindungen, die nur in einen Teil dieses 4-Stadien-Prozesses involviert sind und daher nicht als komplette Karzinogene zu verstehen sind. So zum Beispiel zeichnen sich Mutagene dadurch aus, dass sie den Prozess initiieren indem sie die primäre DNA-Läsion induzieren. Andere Verbindungen hingegen beeinflussen die Expression und Progression der initialen DNA-Veränderung und werden als Tumorverstärker verstanden. Diese müssen nicht zwingend mit der DNA interagieren und sind nicht mutagen. Zu ihnen gehören die Tumorpromotoren. Die Verbindungen einer dritten Gruppe, die der kompletten Karzinogene, besitzen initiierende und promovierende Aktivitäten. Verbindungen, die einen DNA-Schaden verursachen, der zu Mutationen oder Krebs führt (Initiatoren und Karzinogene) werden als Genotoxine beschrieben.

Die Ergebnisse der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen an humanen Darmepithelzellen weisen nach Exposition gegenüber den verschiedenen 2ACB DNA-Läsionen sowohl in gesunden primären Darmepithelzellen, als auch in Zellen eines frühen Adenomstadiums nach, welche weniger stark ausgeprägt waren als in den Primärzellen. Weiterhin führte die im Comet Assay als nicht-genotoxisch erkennbare Konzentration von 150 μ M 2dDCB in diesen Adenomzellen zu zytogenetischen Veränderungen klastogenen

Charakters. Darüber hinaus konnten in der INTERREG II Studie Promotoreffekte der untersuchten 2ACB in Ratten gefunden werden.

Basierend auf den bisher vorliegenden Ergebnissen verschiedener Studien zur Toxizität der 2ACB besitzen 2ACB molekular-toxikologische Eigenschaften von Karzinogenen und Genotoxinen.

5. ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSFOLGERUNGEN

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der molekular-toxikologischen Charakterisierung von 2-Alkylcyclobutanonen (2ACB). Diese Gruppe organischer Verbindungen umfasst die durch ionisierende Strahlen entstehenden zyklischen Derivate von häufig in Lebensmitteln vorkommenden Fettsäuren. 2ACB wurden bisher ausschließlich in bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln gefunden und werden als Nahrungsmittelkontaminanten verstanden [1].

Diese Kontaminanten werden als indirekte Lebensmittelzusätze angesehen und unterliegen damit der Empfehlung der FDA auf eine Sicherheitsprüfung, wenn sie in Mengen größer als 1,5 µg pro Tag konsumiert werden (threshold of toxicological concern, TTC) [161-162, 227]. Eine Portion mit 3 kGy bestrahltem Hähnchenfleisch von 200 g übersteigt bereits diesen Grenzwert für jedes einzelne Cyclobutanon und rechtfertigt daher Sicherheitsuntersuchungen hinsichtlich der Genotoxizität und der Mutagenität dieser Verbindungen.

Die Untersuchungen wurden mit ausgewählten radiolysespezifischen Fettsäurederivaten, drei 2-Alkylcyclobutanonen und einem Lakton, in humanen Kolonzellsystemen unterschiedlichen Transformationsgrades durchgeführt. Da in Lebensmitteln hauptsächlich Palmitin-, Stearin- und Ölsäure sowie etwas weniger Palmitoleinsäure vorkommen, werden durch Bestrahlung vor allem 2dDCB, 2tDCB, 2tDeCB und 2dDeCB gebildet. Diese 2ACB stellen somit die wichtigsten Substanzen für eine toxikologische Betrachtung von bestrahlten Lebensmitteln dar.

Für die einzelnen Teilziele dieser Arbeit lässt sich Folgendes zusammenfassen:

Zytotoxische Effekte der 2ACB nach Kurzzeitinkubation sind zellspezifisch

- Die Inkubation von HT29clone19A Kolontumorzellen mit den Cyclobutanonverbindungen führte weder konzentrations- noch zeitabhängig zu einer Verminderung der Zellvitalität.
- Eine akut-toxische Wirkung der 2ACB in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit trat nur in primär-ähnlichen LT97 Adenomzellen und in frisch isolierten primären Kolonzellen auf. 2-Dodecylcyclobutanon (2dDCB) zeigte in beiden Zellsystemen das stärkste Wirkpotenzial, wobei die primären Zellen mit einer 3-fach höheren Sensitivität reagierten als die LT97 Zellen.

Somit sind neben Adenomzellen auch primäre, gesunde Darmepithelzellen der Hauptangriffspunkt für akut-toxische Zellschäden durch 2ACB. Zelluläre Schäden dieser Art werden, wenn sie *in vivo* chronisch in Form irreversibler Membranschäden auftreten, als

möglicher Auslöser für eine gesteigerte Proliferation bzw. Induktion einer regenerativen Hyperplasie diskutiert, einem nicht-genotoxischen Mechanismus im Prozess der Kanzerogenese.

Unter relevanten Expositionsbedingungen, d.h. beim Verzehr von bestrahlten Lebensmitteln, ist anzunehmen, dass die getesteten Verbindungen nicht toxisch wirken, da die in den verschiedenen Zellsystemen *in vitro* effektiven Konzentrationen ein Vielfaches der physiologisch relevanten Mengen darstellen.

2ACB zeigen auf der DNA-Ebene differierende Wirkpotenziale in Kolonzellen unterschiedlicher Transformation

- Erstmalig wurden *in vitro* durch nicht-zytotoxische Konzentrationen des 2dDCB signifikante DNA-Schäden in humanen Kolonzellen induziert.
- Im Vergleich zu HT29clone19A Kolontumorzellen reagierten primär-ähnliche und primäre Zellen besonders sensitiv auf 2dDCB und 2tDeCB.
- Kolontumorzellen sind kein wichtiger Angriffspunkt für DNA-Schäden durch 2ACB. Trotz fehlender eindeutiger Dosis-Wirkungszusammenhänge sind in erster Linie gesunde Kolonzellen und frühe Entartungsstadien, wie das Adenom, Ziel DNA-schädigender Wirkungen ausgehend von 2ACB, speziell von 2dDCB.

Die neuen Daten zur Induktion von 2ACB-vermittelten signifikanten DNA-Schäden sowohl in Adenom- als auch in primären Kolonzellen postulieren zusammen mit Ergebnissen aus früheren *in vitro*- und *in vivo*-Studien eine zellspezifische Wirkungsweise der Cyclobutanone. Genotoxische Effekte oder damit assoziierte Ereignisse treten nur in nicht malignen Zellen auf oder sind in diesen nachweisbar. Durch die neu gewonnenen Ergebnisse zur akuten Zytotoxizität und den DNA-schädigenden Eigenschaften der 2ACB bestätigt sich ein bereits in vorangegangenen Untersuchungen festgestellter Einfluss der Länge der Alkylgruppe in der Ringposition 2 des Cyclobutanonmoleküls auf das toxische Potenzial. Darüber hinaus bietet der Vergleich der Effekte der Kettenlänge von Fettsäuren und 2ACB in verschiedensten Zellsystemen einen Ansatz zur Erklärung des starken Wirkpotenzials der kurzkettigen 2ACB in primären und gering transformierten Kolonzellen und weisen auf einen ähnlichen Mechanismus hin.

2-Dodecylcyclobutanon ist in LT97 Adenomzellen klastogen

- Das klastogene Potenzial zeigte sich in mehr als 40 von 50 bewerteten Zellen; der Anteil von 86% aberranter Metaphasekerne (150 µM 2dDCB) zeigte mit zunehmender

Anzahl von Chromosomenbrüchen bei steigenden 2dDCB Konzentrationen überwiegend strukturelle Chromosomenveränderungen in Form von Deletionen (40% aller Brüche) und Isochromosomen.

- 2dDCB führte besonders in den tumorrelevanten Chromosomen 5, 12, 17 und 18 zu Veränderungen in der Form, dass mehr als 50% aller auftretenden Chromosomenbrüche diese Chromosomen betrafen.
- Ca. 20% aller durch 2dDCB in den Chromosomen 5, 12, 17 und 18 induzierten Brüche bzw. Aberrationen traten allein auf dem Chromosom 17 auf.
- Innerhalb der tumorrelevanten Chromosomen finden sich im Chromosom 17 gehäuft Deletionen (bis zu 71,4% aller, nur die tumorrelevanten Chromosomen betreffenden, Deletionen).
- Das Mutationsspektrum von 2dDCB unterschied sich deutlich von dem des potenziellen Mutagens EMS und von dem des Lipidperoxidationsmetaboliten 4-HNE.
- Für die Durchführung des auf der OECD-Richtlinie 473 basierten Mutagenitätstests erwies sich die nicht zytotoxische Konzentration von 1 mM Ethylmethansulphonat (EMS) als Positivkontrolle geeignet.

Diese Ergebnisse zeigen die Induktion vererbbarer chromosomaler Schäden in der Tochtergeneration der exponierten Zellen. Der hohe Anteil an Chromosomenbrüchen, speziell in Form von Deletionen im Chromosom 17 und weiteren tumorrelevanten Chromosomen, erhöht das Risiko für das Auftreten einer Mutation in tumorrelevanten Protoonko- oder Tumorsuppressorgenen.

Strukturelle Veränderungen des kurzen Armes des Chromosoms 17 als Träger des *TP53* Allels sind ein bedeutender Endpunkt des Wirkpotenzials von 2dDCB in Kolonadenomzellen.

- Ca. 10 % aller durch 2dDCB induzierten Brüche ereigneten sich im Chromosom 17, hier speziell in Form von 17p Deletionen.
- Einen messbaren Effekt hatte 2dDCB auch auf die Integrität des Genabschnitts 17p13, welcher für das Tumorsuppressorprotein TP53 codiert. In ca. 20% der 2dDCB-behandelten Zellen wurden Veränderungen in diesem Gen beobachtet.

Die gezielten Veränderungen im Erbgut sind eine mögliche Erklärung für die im experimentellen Modell zur Kolonkarzinogenese in Ratten gefundene Promoterwirkung der Cyclobutanone. Insbesondere ist eine Veränderung des *TP53* sehr eng mit dem Übergang vom Adenom zum Karzinom verbunden. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die große

Bedeutung von Mutationen im *TP53*. So sind somatische Mutationen des *TP53* in 50% aller Krebsfälle und in bis zu 65% der Fälle von Dickdarmkrebs zu beobachten.

2dDCB reduziert den Gehalt an reduziertem Glutathion in Kolontumorzellen

- Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Glutathion (GSH)-status und der Höhe der durch 2ACB (2dDCB, 2tDCB) induzierten DNA-Schäden in Kolontumorzellen. Eine Zunahme von DNA-Schäden infolge eines durch BSO verminderten intrazellulären GSH-Pools war nicht nachweisbar.
- Die Inkubation von Kolontumorzellen mit 2dDCB führte zu einer kontinuierlichen Abnahme des GSH-Gehaltes mit zunehmender Konzentration und Dauer der Inkubation. In LT97 Adenomzellen veränderte sich der GSH-Gehalt nicht.
- Gesunde primäre Zellen hingegen reagieren auf die Exposition gegenüber 2dDCB mit einem raschen Anstieg des reduzierten GSH. Zeitgleich können zyto- und genotoxische Effekte beobachtet werden.

Die in den primär-ähnlichen und in den primären Kolonzellen zu beobachtenden Zellschäden sind nicht primär auf einen niedrigen Glutathionpool der Zellen zurückzuführen, ein Hinweis darauf, dass dieser nicht zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber Vertretern der 2ACB beiträgt. Daher ist anzunehmen, dass die Konjugation mit GSH keine wesentliche Bedeutung in der Biotransformation der 2ACB hat, sondern möglicherweise nur einen zusätzlichen Weg der Biotransformation darstellt. Denn der reduktive Effekt von 2dDCB auf den intrazellulären GSH-Spiegel der HT29clone19A Zellen schließt nicht aus, dass eine Metabolisierung des Cyclobutanons selbst oder eines, bisher unbekannten, Phase-I Metaboliten durch das GST/GSH-System möglich ist.

Eine 24-stündige Behandlung der LT97 Adenomzellen mit physiologischen Konzentrationen Butyrat (2 mM) resultierte in einer Induktion des GST-Systems auf der Ebene der Gesamtaktivität.

- Die für 24 Stunden mit Butyrat inkubierten LT97 Zellen zeigten auf DNA-Ebene eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber 2dDCB.
- Die Ergebnisse zum DNA-schädigenden Potenzial des 2dDCB in Adenomzellen nach Induktion des GST-Enzymsystems mit dem Ballaststofffermentationsprodukt Butyrat zeigte deutlich dessen paradoxe Wirkungsweise hinsichtlich seiner Rolle eines nutritiven oder Apoptose-induzierenden Faktors in der Interaktion mit dem Dickdarmepithel.

- Das Darmfermentationsprodukt Butyrat schützt LT97 Adenomzellen nicht vor 2dDCB-indizierten DNA-Schäden. Es sensibilisiert vielmehr die Zellen für proapoptotische Signale und führt in Kombination mit 2dDCB zu starken DNA-Schäden. Weiterführend verweist der positive Apoptosenachweis für Butyrat in LT97 Zellen durch die Arbeiten von *SPANGE* auf die chemoprotektiven und chemotherapeutischen Eigenschaften von Butyrat.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur molekulartoxikologischen Beurteilung von 2-Alkylcyclobutanonen in humanen Dickdarmepithelzellen bestätigen Hypothesen früherer Studien und zeigen eine Vielzahl neuer Wirkungspotenziale dieser Verbindungen auf.

Insgesamt besteht in den Zielzellen der Karzinogenese, den gesunden primären und den primär-ähnlichen Kolonepithelzellen, ein stärkeres Wirkpotenzial der 2ACB als in allen anderen bisher untersuchten Zellsystemen. Eine Gesamtbetrachtung aller bereits in der Literatur beschriebenen und neu gewonnenen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die Gruppe der ACB definitionsgemäß zu den chemischen Karzinogenen und Genotoxinen gezählt werden sollte.

6. AUSBLICK

Die Lebensmittelbestrahlung ist eines der am besten untersuchten Verarbeitungsverfahren. Trotzdem stellen sich weiterhin viele Fragen im Hinblick auf die Unbedenklichkeit der dadurch entstehenden Lebensmittelkontaminanten. Schwierig zu bewerten ist vor allem die Gegensätzlichkeit der Ergebnisse in Säugetier- und Bakterientestsystemen. Bereits wichtige Ansätze stellen jedoch erste Studien zur Aufklärung des Metabolismus der 2ACB dar, welcher aufgrund der neu gewonnenen Erkenntnisse zur Toxizität zukünftig noch an Bedeutung gewinnen wird. Neben toxikokinetischen und Transportmechanismen sollten die Identifikation von Konjugaten, Addukten oder intermediären Metaboliten im Vordergrund stehen sowie die Erkennung der Zielorgane der toxischen Effekte. Zur Beurteilung des Risikos dieser Stoffwechselprodukte und deren Ausgangsverbindungen, den 2ACB, müssen validierte toxikologische Tests für die regulatorische Testung von Chemikalien eingesetzt werden. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde bereits durch die Anpassung des Mutagenitätstest nach der OECD Richtlinie 473 getan.

Hinsichtlich der akut-zytotoxischen Wirkung bedarf es einer eindeutigen Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus. Hier könnten Kurzzeitstudien zur Apoptoseinduktion, welche analog den Untersuchungen zur akuten Toxizität an den Zielzellen der Kolonkarzinogenese durchgeführt werden sollten, aufschlussreich sein. Da es durch frühere Studien Hinweise auf oxidative DNA-Schäden in anderen Zellsystemen gibt, wären weiterführende Studien zu Art und Persistenz der DNA-Läsionen sowie zu den induzierten DNA-Reparaturmechanismen sinnvoll. Die ersten Erkenntnisse zur Mutagenität bedürfen einer Verifizierung durch erweiterte Versuche. In Anbetracht der Situation, dass in bestrahlten Lebensmitteln immer mehrere 2ACB gleichzeitig vorkommen, sollte die Testung eines häufig in Lebensmitteln zu erwartenden 2ACB-Gemisches von Bedeutung sein. In diesem Zusammenhang könnten auch weitere Lebensmittelbestandteile wie sekundäre Pflanzenstoffe und andere bioaktive Substanzen, welche gleichzeitig über pflanzliche Kost aufgenommen werden, die Toxizität der 2ACB beeinflussen und somit Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Eine absolute Unschädlichkeit der Verbindungen würde absolute Sicherheit bedeuten. Sicherheit ist jedoch ein relativer Begriff und kann nur durch die Abschätzung eines bestehenden Risikos erlangt werden.

Die genannten Ansätze sollten dazu dienen dieses Risiko besser einschätzen zu können.

7. LITERATUR

1. LeTellier, P.R. and W.W. Nawar, *2-Alkylcyclobutanones from the radiolysis of triglycerides*. *Lipids*, 1972. **7**(1): p. 75-6.
2. Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the United States*. *Emerg Infect Dis*, 1999. **5**(5): p. 607-25.
3. Osterholm, M.T. and A.P. Norgan, *The Role of Irradiation in Food Safety*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(18): p. 1898-1901.
4. Jakszyn, P., et al., Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Nutr*, 2004. **134**(8): p. 2011-4.
5. Boyd, D.R., et al., Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken. *J Agric Food Chem*, 1991. **39**: p. 789-792.
6. Foodborne Outbreak Response and Surveillance Unit. Foodborne Diseases outbreaks due to bacterial etiologies. 2000.
7. Food safety and inspection service, 2003 recall cases.
8. Food irradiation;available research indicates that benefits outweigh risks. 2000, General Accounting Office: Washington D.C.
9. Strauss, S., The ABCs of X-ray food: as health canada polls the nation about using radiation to help kill bacteria in our food, in *Globe and Mail*. 2003. p. R7.
10. Gadgil, P., Evaluation of toxicity, mutagenicity, metabolism and formation of 2-dodecylcyclobutanone in irradiated ground beef. 2006, Kansas State University: Manhattan, Kansas.
11. Satin, M., *Food Irradiation - A guidebook*. 2nd Edition ed. 1996, Basel: Technomic Publishing AG.
12. Derr, D.D., International regulatory status and harmonization of food irradiation. *J. Food Protect.*, 1993. **56**(10): p. 882-886.
13. FDA, Irradiation in the production, processing, and handling of food. *Federal Register*, 1986. **51**(75): p. 13375-13399.
14. FDA, Irradiation in the production, processing, and handling of food. *Federal Register*, 1990. **55**: p. 18538-18544.
15. FDA, Irradiation in the production, processing, and handling of food. *Federal Register*, 1997. **62**(232): p. 64107-64121.
16. Ehlermann, D.A.E., Sicher - doch umstritten
Die Lebensmittelbestrahlung kämpft mit globaler Ablehnung, in *Food Design*. 2000. p. 36 - 37.
17. Brown, B.L. (2002) 1) Food Irradiation and 2) Safe handling of irradiated meats and poultry; four fact sheets: What is irradiation and how are foods irradiated?; What does irradiation do to food?; Labeling and the cost of irradiated foods; and How safe are irradiated foods?
18. Dunkelberg, H., T. Gebel, and A. Hartwig, *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie Belastungen, Wirkungen, Lebensmittelsicherheit, Hygiene*. 2007, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

19. Karlsruhe, B. <http://www.ubka.uni-karlsruhe.de/vvv/1998/sonstige/8/main.html>. Available from: <http://www.ubka.uni-karlsruhe.de/vvv/1998/sonstige/8/main.html>.
20. Loaharanu, P. Irradiated foods, 5th ed. Rev. in American Council on science and health. 2003. New York.
21. Tauxe, R.V., Food safety and irradiation: protecting the public from foodborne infections. *Emerg Infect Dis*, 2001. 7(3 Suppl): p. 516-21.
22. Sommers, C.H., et al., *Toxicological safety of irradiated foods*, in *Food Irradiation Research and Technology*, C.H. Sommers and X. Fan, Editors. 2006, Blackwell Publishing Professional: Ames, Iowa. p. 43-61.
23. Marchioni, E. and H. Delincée, Toxikologische Untersuchung zur Risikobewertung beim Verzehr von bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln - eine französisch-deutsche Studie im Grenzraum Oberrhein. 2002, Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE-R-02-02): Karlsruhe. p. 105-198.
24. Ehlermann, D.A.E., *Die Strahlensonservierung von Lebensmitteln*, H. Delincee, Editor. 1998, Bundesforschungsanstalt für Ernährung.
25. Molins, R.A., *Irradiation of meat and poultry*, in *Food irradiation: principles and applications*, R.A. Molins, Editor. 2001, John Wiley: New York. p. 131-192.
26. Delincée, H., *Lebensmittelbestrahlung-Zulassung in Staaten der Europäischen Union Stand 20.07.2002*. 2002, Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe: Karlsruhe.
27. DIRECTIVE 1999/3/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 February 1999 on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation in: *Official Journal of the European Communities*. 1999. p. L66/24-25.
28. Gadgil, P., et al., 2-alkylcyclobutanones as irradiation dose indicators in irradiated ground beef patties. *J Agric Food Chem*, 2002. 50(20): p. 5746-50.
29. Shukla, L.I., et al., EPR Studies on gamma-Irradiated Barley Seeds: Identification of Trapped Electrons. *J Agric Food Chem*, 2001. 49(11): p. 5273-5278.
30. Stevenson, M.H., A.V.J. Crone, and J.T.G. Hamilton, *Irradiation detection*. *Nature*, 1990. 344(6263): p. 202-203.
31. Crone, A.V.J., et al., Synthesis, characterization and use of 2-tetradecylcyclobutanone together with other cyclobutanones as markers of irradiated liquid whole egg. *J. Sci. Food Agr.*, 1993. 62: p. 361-367.
32. WHO, Wholesomeness of irradiated food report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. 1981, World Health Organization: Geneva.
33. Delincée, H. and B.L. Pool-Zobel, Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. *Radiation Physics and Chemistry*, 1998. 52: p. 39-42.
34. Delincée, H., B.L. Pool-Zobel, and G. Rechkemmer, *Genotoxicity of 2-dodecylcyclobutanone*, in *Report by the Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE-R--99-01)*. 1999, Institute for Nutritional Physiology of the Federal Nutrition Research Institute: Karlsruhe, Germany. p. 262-269.

35. Miesch, M., et al., 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs I. Synthesis of saturated and unsaturated standards. *Radiation Physics and Chemistry*, 1999. **55**: p. 337-344.
36. Stevenson, M.H., Validation of the Cyclobutanone Protocol for Detection of Irradiated Lipid Containing Foods by Interlaboratory Trial., in *Detection Methods for Irradiated Food - Current Status*, C.H. McMurray, et al., Editors. 1996, Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. p. 269-284.
37. Stevenson, M.H., et al., The use of 2-dodecylcyclobutanone for the identification of irradiated chicken meat and eggs. *Radiation Physics and Chemistry*, 1993. **42**: p. 363.
38. Stevenson, M.H. and J.T. Hamilton, *Irradiation detection*. *Nature*, 1990. **344**(6263): p. 202-203.
39. Crone, A.V.J., J.T.G. Hamilton, and M.H. Stevenson, *Effects of storage and cooking on the dose response of 2-dodecylcyclobutanone, a potential marker for irradiated chicken*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1992a. **58**: p. 249-252.
40. Crone, A.V.J., J.T. Hamilton, and M.H. Stevenson, *Detection of 2-dodecylcyclobutanone in radiation sterilized chicken meat stored for several years*. *Int J Food Sci Technol*, 1992b. **27**: p. 691-696.
41. Thayer, D.W., et al., *Toxicology studies of irradiation-sterilized chicken*. *J Food Prot*, 1987. **50**: p. 278-288.
42. Delincee, H., et al., Genotoxicity of 2-alkylcyclobutanones, markers for an irradiation treatment in fat-containing food-Part I: cyto- and genotoxic potential of 2-tetradecylcyclobutanone. *Radiation Physics and Chemistry*, 2002. **63**(3-6): p. 431-435.
43. Raul, F., et al., Food-borne radiolytic compounds (2-alkylcyclobutanones) may promote experimental colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*, 2002. **44**(2): p. 189-91.
44. Gadgil, P. and J.S. Smith, *Mutagenicity and acute toxicity evaluation of 2-dodecylcyclobutanone*. *Journal of Food Science*, 2004. **69**(9): p. 713-716.
45. Sommers, C.H., 2-Dodecylcyclobutanone does not induce mutations in the Escherichia coli tryptophan reverse mutation assay. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(21): p. 6367-70.
46. Sommers, C.H. and R.H. Schiestl, 2-Dodecylcyclobutanone does not induce mutations in the Salmonella mutagenicity test or intrachromosomal recombination in Saccharomyces cerevisiae. *J Food Prot*, 2004. **67**(6): p. 1293-8.
47. SCF and S.C.o. Food, Statement of the Scientific Committee on Food on a Report on 2-alkylcyclobutanones. 2002, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General: Brussels.
48. Vajdi, M., W.W. Nawar, and C. Merritt, Jr., *Formation of gamma and delta lactones in irradiated beef*. *J Am Oil Chem Soc*, 1979. **56**(10): p. 906-7.
49. Elliott, C.T., et al., Detection of irradiated chicken meat by analysis of lipid extracts for 2-substituted cyclobutanones using an enzyme linked immunosorbent assay. *Analyst*, 1995. **120**(9): p. 2337-41.
50. Hamilton, L., et al., The use of 2-substituted cyclobutanones in the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of irradiated

- foods. Detection methods for irradiated foods. Current status, ed. C.H. McMurray, et al. 1996, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
51. Gadgil, P. and J.S. Smith, Metabolism by rats of 2-dodecylcyclobutanone, a radiolytic compound present in irradiated beef. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(13): p. 4896-900.
 52. Burka, L.T., K.D. Washburn, and R.D. Irwin, *Disposition of [14C]furan in the male F344 rat*. *J Toxicol Environ Health*, 1991. **34**(2): p. 245-57.
 53. Mraz, J., et al., 1,2- and 1,4-Cyclohexanediol: major urinary metabolites and biomarkers of exposure to cyclohexane, cyclohexanone, and cyclohexanol in humans. *Int Arch Occup Environ Health*, 1998. **71**(8): p. 560-5.
 54. Horvatovich, P., et al., Detection of 2-alkylcyclobutanones, markers for irradiated foods, in adipose tissues of animals fed with these substances. *J Food Prot.*, 2002. **Oct**; **65**(10): p. 1610-3.
 55. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
 56. Peto, R., et al., *Cancer and ageing in mice and men*. *Br J Cancer*, 1975. **32**(4): p. 411-26.
 57. Strachan, T. and A.P. Read, *Cancer Genetics-two ways of making a series of successive mutations more likely*, in *Human Molecular Genetics 2*. 1999, BIOS Scientific Publishers Ltd: Oxford, UK.
 58. Shibata, D., et al., Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. 1994. **6**(3): p. 273-281.
 59. Mendelsohn, J., *The Molecular Basis of Cancer.*, M. J, Editor. 2001, Saunders Company: Philadelphia.
 60. Bishop, J.M., *Cancer: the rise of the genetic paradigm*. *Genes Dev*, 1995. **9**(11): p. 1309-15.
 61. Buselmaier, W. and G. Tariverdian, *Humangenetik*. 1999, Berlin: Springer Verlag.
 62. Cho, K.R. and B. Vogelstein, *Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence*. *J Cell Biochem Suppl*, 1992. **16G**: p. 137-41.
 63. <http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/tzyt.htm>. *Molekularzytogenetische Tumordiagnostik*. 2005 2005.
 64. Hahn, S.A., et al., DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, 1996. **271**(5247): p. 350-3.
 65. Takagi, Y., et al., Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer*, 1998. **78**(9): p. 1152-5.
 66. Fearon, E.R., et al., Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 1990. **247**(4938): p. 49-56.
 67. Sarasin, A., An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 2003. **544**(2-3): p. 99-106.
 68. Shih, I.M., et al., Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 2001. **61**(3): p. 818-22.

69. Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens, *Catalog of chromosomal aberrations in cancer*. Vol. 2. 1994, New York: Wiley-Liss.
70. Harvey, M., et al., In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene*, 1993. **8**(9): p. 2457-67.
71. Bardi, G., et al., Cytogenetic comparisons of synchronous carcinomas and polyps in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1997. **76**(6): p. 765-9.
72. Baker, S.J., et al., p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 1990. **50**(23): p. 7717-22.
73. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instability in colorectal cancers*. *Nature*, 1997. **386**(6625): p. 623-7.
74. Eshleman, J.R., et al., Chromosome number and structure both are markedly stable in RER colorectal cancers and are not destabilized by mutation of p53. *Oncogene*, 1998. **17**(6): p. 719-25.
75. Perucho, M., *Cancer of the microsatellite mutator phenotype*. *Biol Chem*, 1996. **377**(11): p. 675-84.
76. Saetta, A.A., et al., Expression of mismatch repair enzymes, hMLH1 and hMSH2 is not associated with microsatellite instability and P53 protein accumulation in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol Res*, 2005. **297**(3): p. 99-107.
77. Thomas, D.C., A. Umar, and T.A. Kunkel, *Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer*. *Mutat Res*, 1996. **350**(1): p. 201-5.
78. Aaltonen, L.A., et al., *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer*. *Science*, 1993. **260**(5109): p. 812-6.
79. Thibodeau, S.N., G. Bren, and D. Schaid, *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon*. *Science*, 1993. **260**(5109): p. 816-9.
80. Ionov, Y., et al., Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. 1993. **363**(6429): p. 558-561.
81. Herman, J.G., et al., Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma 10.1073/pnas.95.12.6870. *PNAS*, 1998. **95**(12): p. 6870-6875.
82. *Krebs in Deutschland 2003 - 2004 Häufigkeiten und Trends*. 2008, Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Berlin.
83. Todesursachen in Deutschland- Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen. 2007, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden 2009.
84. Becker, N., *Cancer mortality and prevention in the European Union*. *Eur J Surg Oncol*, 1998. **24**(5): p. 370-4.
85. Willett, W.C., *Diet, nutrition, and avoidable cancer*. *Environ Health Perspect*, 1995. **103 Suppl 8**: p. 165-70.
86. WHO, *Prevention of Cancer*. 1964, World Health Organization: Geneva.
87. Willett, W.C., *Diet and cancer*. *Oncologist*, 2000. **5**(5): p. 393-404.
88. Doll, R. and R. Peto, The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 1981. **66**(6): p. 1191-308.

89. Slattery, M.L., *Diet, lifestyle, and colon cancer*. Semin Gastrointest Dis, 2000. **11**(3): p. 142-6.
90. Knöbel, Y., et al., Ferric iron increases ROS formation, modulates cell growth and enhances genotoxic damage by 4-hydroxynonenal in human colon tumor cells. Toxicol In Vitro, 2006.
91. Glei, M., et al., *Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2006. **594**(1-2): p. 162-171.
92. Nelson, R.L., *Iron and colorectal cancer risk: human studies*. Nutr Rev, 2001. **59**(5): p. 140-8.
93. Kim, Y.I. and J.B. Mason, Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: a critical review. Nutr Rev, 1996. **54**(9): p. 259-79.
94. Nagengast, F.M., M.J. Grubben, and I.P. van Munster, *Role of bile acids in colorectal carcinogenesis*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(7-8): p. 1067-70.
95. Sinha, R., et al., Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(5): p. 559-62.
96. Anderson, K.E., et al., Meat intake and cooking techniques: associations with pancreatic cancer. Mutat Res, 2002. **506-507**: p. 225-31.
97. Ferguson, L.R. and P.J. Harris, *The dietary fibre debate: more food for thought*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1487-8.
98. Rieger, M.A., et al., A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. Carcinogenesis, 1999. **20**(12): p. 2311-6.
99. Potter, J.P., A. Chavez, and C.e. al., *Food, Nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. 1997, World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research: Washington, DC.
100. WCRF/AICR, *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. 2007, World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research: Washington DC. p. 284.
101. Cummings, J.H., *Short chain fatty acids in the human colon*. Gut, 1981. **22**(9): p. 763-79.
102. Roediger, W.E., Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. Gastroenterology, 1982. **83**(2): p. 424-9.
103. Hass, R., et al., Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. Gastroenterology, 1997. **112**(3): p. 875-81.
104. Scheppach, W., et al., *Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1992. **16**(1): p. 43-8.
105. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2008. **27**(2): p. 104-119.
106. Roediger, W.E. and S. Nance, Selective reduction of fatty acid oxidation in colonocytes: correlation with ulcerative colitis. Lipids, 1990. **25**(10): p. 646-52.

107. Solomon, M.J. and M. Schnitzler, Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment. *World J Surg*, 1998. **22**(4): p. 352-8.
108. Gibson, P.R., et al., Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(4): p. 539-44.
109. Heavey, P.M., D. McKenna, and I.R. Rowland, *Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment*. *Nutr Cancer*, 2004. **48**(2): p. 124-41.
110. de la Chapelle, A., *Genetic predisposition to colorectal cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(10): p. 769-80.
111. Sutton, W.S., *The chromosomes in heredity*. *Biological Bulletin*, 1903. **4**: p. 231-251.
112. Caspersson, T., et al., *Chemical differentiation along metaphase Chromosomes*. *Exp Cell Res.*, 1968. **49**(1): p. 219-22.
113. Weise, A., Identifizierung und Charakterisierung putativ evolutionär relevanter Genomregionen der Hominidae, in Institut für Humangenetik und Anthropologie. 2008, Friedrich-Schiller-Universität: Jena. p. 3-4.
114. Pardue, M.L. and J.G. Gall, *Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1969. **64**(2): p. 600-4.
115. Gall, J.G. and M.L. Pardue, *Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1969. **63**(2): p. 378-83.
116. John, H.A., M.L. Birnstiel, and K.W. Jones, *RNA-DNA hybrids at the cytological level*. *Nature*, 1969. **223**(206): p. 582-7.
117. Pinkel, D., T. Straume, and J.W. Gray, *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(9): p. 2934-8.
118. Telenius, H., et al., Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 1992. **13**(3): p. 718-25.
119. Cherif, D., O. Bernard, and R. Berger, Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes. *Hum Genet*, 1989. **81**(4): p. 358-62.
120. Viegas-Pequignot, E., et al., Localization of a 900-bp-long fragment of the human choline acetyltransferase gene to 10q11.2 by nonradioactive in situ hybridization. *Genomics*, 1991. **9**(1): p. 210-2.
121. Speicher, M.R. and R. Eils, *Multiplex-FISH (M-FISH): Ein neues Verfahren in der zytogenetischen Diagnostik*. *Biospektrum*, 1998. **Sonderdruck aus 2/98**: p. 83-86.
122. Augeron, C. and C.L. Labois, Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res*, 1984. **44**(9): p. 3961-9.
123. Fogh, J. and G. Trempe, New human tumor cell lines, in *Human tumor cells in vitro*, J. Fogh, Editor. 1975, Plenum Press: New York. p. 115-141.
124. Marian, B., In vitro models for the identification and characterization of tumor-promoting and protective factors for colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, 2002. **40**(8): p. 1099-104.
125. Kawai, K., et al., *Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **34**(1): p. 1-8.

126. Kuechler, A., et al., Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multicolor banding. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. **36**(2): p. 207-10.
127. Richter, M., et al., Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *European Journal of Cancer*, 2002. **38**(14): p. 1937-1945.
128. Schaeferhenrich, A., et al., Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res*, 2003a. **526**(1-2): p. 19-32.
129. Jagielski, M., et al., [Applicability of DAPI for the detection of Mycoplasmas in cell cultures]. *Med Dosw Mikrobiol*, 1976. **28**(2): p. 161-73.
130. Schaeferhenrich, A., et al., Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol*, 2003b. **41**(5): p. 655-64.
131. Verma, R.S. and A. Babu, *Human chromosomes -manual of basic technologies*. Pergamon Press, New York, 1989.
132. Scheil, S., et al., Genome-wide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **32**(3): p. 203-11.
133. Liehr, T., et al., Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med*, 2002. **9**(4): p. 335-9.
134. Blumenstock, *Monatsheft Chemie*, 1925. **46**(344).
135. Knoll, N., et al., Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol Sci*, 2005. **86**(1): p. 27-35.
136. Sandström, B., *Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 1965. **37**: p. 552-568.
137. Östling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA-damages in individual cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 1984. **123**: p. 291-298.
138. Singh, N.P., et al., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988. **175**(1): p. 184-91.
139. Cook, P.R. and I.A. Brazell, *Supercoils in human DNA*. *J Cell Sci*, 1975. **19**(2): p. 261-79.
140. Tice, R.R., et al., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 2000. **35**(3): p. 206-21.
141. Knoll N., P.-Z.B.L., *Zwischenbericht Forschungsvorhaben 99 HS 039*, in *Jahresbericht*. 2002, Institut für Ernährungswissenschaften, Ernährungstoxikologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena: Jena.
142. Knoll, N., et al., 2-Dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, is genotoxic in primary human colon cells and in cells from preneoplastic lesions. *Mutat Res*, 2006. **594**(1-2): p. 10-19.
143. Griffith, O.W. and A. Meister, Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem*, 1979. **254**(16): p. 7558-60.

144. Bray, T.M. and C.G. Taylor, *Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress*. Can J Physiol Pharmacol, 1993. **71**(9): p. 746-51.
145. OECD, *OECD TG 473, In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*. In: OECD Guidance for Testing of Chemicals, 1997.
146. Knoll, N., et al. Application of Fluorescence in-situ Hybridisation (24-Color-FISH) for testing mutagenicity of ethylmethanesulphonate in preneoplastic human colon cells using the OECD Guideline 473. in 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik. 2006. Heidelberg.
147. Claussen, U., et al., Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. Cytogenetic Genome Research, 2002. **98**: p. 136-146.
148. Claussen, U., et al., Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. Cytogenetic and Genome Research, 2002. **98**(2-3): p. 136-146.
149. Schaeferhenrich, A., et al., Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. Mutat Res, 2003. **526**(1-2): p. 19-32.
150. Ebert, M.N., et al., Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. Nutr Cancer, 2001. **41**(1-2): p. 156-64.
151. Ebert, M.N., et al., Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. Carcinogenesis, 2003. **24**(10): p. 1637-44.
152. Mitelman, F., ed. An international System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995. 1995, S. Karger Verlag: Basel.
153. Alazzouzi, H., et al., *SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(7): p. 2606-11.
154. Stevenson, M.H., *Identification of irradiated foods*. Food Technol., 1994. **48**(5): p. 141-144.
155. Tewfik, I.H., H.M. Ismail, and S.A. Sumar, A rapid supercritical fluid extraction method for the detection of 2-alkylcyclobutanones in gamma irradiated beef and chicken. Lebensm-Wiss.-Technol., 1998. **31**: p. 366-370.
156. Stewart, E.M., et al., 2-Alkylcyclobutanones as markers for the detection of irradiated mango, papaya, Camembert cheese and salmon meat. J Sci Food Agric, 2002. **80**: p. 121-130.
157. Lee, H.J., L. Myung, and K.S. Kim, Detection of radiation-induced hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones from peanuts. J Sci Food Nutr, 1999. **4**: p. 270-275.
158. Lee, H.J., M.W. Byun, and K.S. Kim, Detection of radiation-induced hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones in irradiated perilla seeds. J Food Prot, 2000. **63**(11): p. 1563-9.
159. Park, E.R., E.A. Kim, and K.S. Kim, Detection of radiation induced hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones from irradiated pork. Fodd Sci Biotechnol, 2001. **10**: p. 84-89.
160. Gadgil, P., et al., Evaluation of 2-dodecylcyclobutanone as an irradiation dose indicator in fresh irradiated ground beef. J Agric Food Chem, 2005. **53**(6): p. 1890-3.

161. Matthews, E.J. and E.J. Machuga, *Threshold of estimated toxicity for regulation of indirect food additives*. Toxicol Lett, 1995. **79**(1-3): p. 123-9.
162. Kroes, R. and G. Kozianowski, *Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment*. Toxicol Lett, 2002. **127**(1-3): p. 43-6.
163. Sommers, C.H., *Safety Testing of 2-Alkylcyclobutanones Unique Radiolytic Products*. 2005, Japanese Research Association for Food Irradiation (JRAFI), Tokyo, Japan. p. 7-12.
164. Wakabayashi, K., et al., *Food-derived mutagens and carcinogens*. Cancer Res, 1992. **52**(7 Suppl): p. 2092s-2098s.
165. Goldman, R. and P.G. Shields, *Food mutagens*. J Nutr, 2003. **133 Suppl 3**: p. 965S-973S.
166. Preussmann, R. and B.W. Stewart, *N-nitrosocarcinogens*, in *Chemical Carcinogens*, C.E. Searle, Editor. 1984, American Chemical Society: Washington D.C. p. 643-823.
167. Eisenbrand, G. and W. Tang, Food-borne heterocyclic amines. Chemistry, formation, occurrence and biological activities. A literature review. Toxicology, 1993. **84**(1-3): p. 1-82.
168. Turesky, R.J., Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. Drug Metab Rev, 2002. **34**(3): p. 625-50.
169. Layton, D.W., et al., Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. Carcinogenesis, 1995. **16**(1): p. 39-52.
170. Tricker, A.R., N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. Eur J Cancer Prev, 1997. **6**(3): p. 226-68.
171. Glisic-Milosavljevic, S., et al., Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods. Cell Prolif, 2005. **38**(5): p. 301-11.
172. Berridge, M.V., et al., The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. Boehringer Biochemica, 1996. **4**: p. 14-19.
173. Sommers, C.H., Induction of Micronuclei in Human Tk6 Lymphoblasts by 2-Dodecylcyclobutanone, a Unique Radiolytic Product of Palmitic Acid. Journal of Food Science, 2006. **71**(5): p. C281-C284.
174. Melnick, R.L., M.C. Kohn, and C.J. Portier, *Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 1**: p. 123-34.
175. Cohen, S.M. and L.B. Ellwein, *Cell proliferation in carcinogenesis*. Science, 1990. **249**(4972): p. 1007-11.
176. Dietrich, D.R. and J.A. Swenberg, Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. Mutat Res, 1991. **248**(2): p. 239-60.
177. Silva Lima, B. and J.W. Van der Laan, *Mechanisms of nongenotoxic carcinogenesis and assessment of the human hazard*. Regul Toxicol Pharmacol, 2000. **32**(2): p. 135-43.
178. Ames, B.N. and L.S. Gold, *Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7772-6.

179. Tong, C., M. Fazio, and G.M. Williams, Cell cycle-specific mutagenesis at the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus in adult rat liver epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(12): p. 7377-9.
180. Hawkins, R.A., K. Sangster, and M.J. Arends, Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol*, 1998. **185**(1): p. 61-70.
181. Lima, T.M., et al., Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicol In Vitro*, 2002. **16**(6): p. 741-7.
182. Begin, M.E., G. Ells, and D.F. Horrobin, Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J Natl Cancer Inst*, 1988. **80**(3): p. 188-94.
183. Colquhoun, A. and R. Curi, Effects of saturated and polyunsaturated fatty acids on human tumor-cell proliferation. *Gen Pharmacol*, 1998. **30**(2): p. 191-4.
184. Andrade, L.N., et al., *Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines*. *Toxicol In Vitro*, 2005. **19**(4): p. 553-60.
185. Beeharry, N., et al., Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutat Res*, 2003. **530**(1-2): p. 27-33.
186. Shimabukuro, M., et al., *Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2498-502.
187. Mu, Y.M., et al., Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology*, 2001. **142**(8): p. 3590-7.
188. Delincée, H., B.L. Pool-Zobel, and G. Rechkemmer, *Genotoxicity of 2-dodecylcyclobutanone*, in *Report by the Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE-R--99-01)*. 1998, Institute for Nutritional Physiology of the Federal Nutrition Research Institute: Karlsruhe, Germany. p. 262-269.
189. Delincee, H., B.L. Pool, and G. Rechkemmer, *Genotoxicity of 2-Dodecylcyclobutanone, a compound formed in fat-containing food treated by ionizing radiation*. 1999, Institute of Nutritional Physiology, Federal Research Centre for Nutrition: Karlsruhe.
190. Hayes, J.D. and R.C. Strange, Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 2000. **61**(3): p. 154-66.
191. Knoll, N., Untersuchungen zur Hemmung des Glutathion-/Glutathion S-Transferase-Systems in humanen Dickdarmzellen und dessen Auswirkungen auf die Genotoxizität von 4-Hydroxy-2-nonenal. Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2001.
192. Anderson, M.E., *Glutathione and glutathione delivery compounds*. *Adv Pharmacol*, 1997. **38**: p. 65-78.
193. Crook, T.R., et al., Glutathione depletion as a determinant of sensitivity of human leukemia cells to cyclophosphamide. *Cancer Res*, 1986. **46**(10): p. 5035-8.
194. Mitchell, J.B., et al., *Glutathione modulation in cancer treatment: will it work?* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1989. **16**(5): p. 1289-95.
195. Terradez, P., et al., Depletion of tumour glutathione in vivo by buthionine sulfoximine: modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. *Biochem J*, 1993. **292 (Pt 2)**: p. 477-83.

196. Madesh, M., O. Benard, and K.A. Balasubramanian, *Glutathione modulates lipid composition of human colon derived HT-29 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(12): p. 1345-52.
197. Spitz, D.R., et al., Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(4): p. 415-23.
198. Hubatsch, I., M. Ridderstrom, and B. Mannervik, Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. Biochem J, 1998. **330** (Pt 1): p. 175-9.
199. Uchida, K., et al., Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2234-42.
200. Pool-Zobel, B., S. Veeriah, and F.D. Bohmer, Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens-focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. Mutat Res, 2005. **591**(1-2): p. 74-92.
201. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.
202. Spange, S., Untersuchungen zur Genotoxizität von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in der Adenomzelllinie LT97 und in primären Kolonozyten unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Butyrat, in Department of Nutritional Toxicology. 2005, Friedrich Schiller University: Jena.
203. Otton, R. and R. Curi, Toxicity of a mixture of fatty acids on human blood lymphocytes and leukaemia cell lines. Toxicol In Vitro, 2005. **19**(6): p. 749-55.
204. Avivi-Green, C., Z. Madar, and B. Schwartz, Pectin-enriched diet affects distribution and expression of apoptosis-cascade proteins in colonic crypts of dimethylhydrazine-treated rats. Int. J. Mol. Med., 2000. **6**: p. 689-698.
205. Avivi-Green, C., et al., Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. Oncol. Res., 2000. **12**: p. 83-95.
206. Hassig, C.A., J.K. Tong, and S.L. Schreiber, *Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer*. Chem. Biol., 1997. **4**: p. 783-789.
207. Schwartz, B., C. Avivi-Green, and S. Polak-Charcon, Butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. Mol. Cell. Biochem., 1998. **188**(21-30).
208. Nakano, K., et al., Butyrate activates WAF1/Cip 1 gene promoter through SP1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. J. Biol. Chem., 1997. **272**: p. 22199-22206.
209. Avivi-Green, C., et al., Different Molecular Events Account for Butyrate-induced Apoptosis in Two Human Colon Cancer Cell Lines. J. Nutr., 2002. **132**(7): p. 1812-1818.
210. Durrieu, F., et al., Caspase activation is an early event in anthracycline-induced apoptosis and allows detection of apoptotic cells before they are ingested by phagocytes. Exp. Cell Res., 1998. **4**: p. 165-175.

211. Krohn, A.J., E. Preis, and J.H.M. Prehn, Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J. Neurosci.*, 1998. **18**: p. 8186-8197.
212. Liu, X., et al., Purification and characterization of an interleukin-1 β -converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *J. Biol. Chem.*, 1996. **271**: p. 13371-13376.
213. Rummele, F.M., et al., Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic Bak and inducing caspase-3-mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death Differ*, 1999. **6**: p. 729-735.
214. Moss, S.F., et al., *Increased intestinal Bak-expression results in apoptosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 1996. **223**: p. 199-203.
215. Beg, A.A. and D. Baltimore, An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
216. Sauer, J., K.K. Richter, and B.L. Pool-Zobel, Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *Br J Nutr*, 2007. **97**(5): p. 928-37.
217. Mortelmans, K. and E.S. Riccio, The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutat Res*, 2000. **455**(1-2): p. 61-9.
218. Mortelmans, K. and E. Zeiger, *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. *Mutat Res*, 2000. **455**(1-2): p. 29-60.
219. Senger, G., I. Chuboda, and A. Plesch, Multicolor-FISH - the identification of chromosome aberrations by 24 colors, in *BIOforum*. 1998. p. 499-503.
220. Speicher, M.R., S. Gwyn Ballard, and D.C. Ward, *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH*. *Nat Genet*, 1996. **12**(4): p. 368-75.
221. Bonassi, S., et al., Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res*, 2000. **60**(6): p. 1619-25.
222. Fearon, E.R., Molecular genetic studies of the adenoma-carcinoma sequence. *Adv Intern Med*, 1994. **39**: p. 123-47.
223. Heim, S. and F. Mitelman, *Cancer. Cytogenetics*. 2nd ed. Tumors of the digestive tract., ed. S. Heim and F. Mitelman. 1995, New York: Wiley-Liss. 332-340.
224. Tübingen;U.
http://www.uni-tuebingen.de/uni/bce/handouts/einfgenetik/Genetik_5_Mutationen2.pdf.
225. Kaufmann, W. and R. Paules, *DNA damage and cell cycle checkpoints*. *FASEB J.*, 1996. **10**(2): p. 238-247.
226. Schumacher, D., Untersuchungen zur genotoxischen und mutagenen Wirkung des Mykotoxins Patulin, in Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH): Karlsruhe. 2005
227. Barlow, S.M., et al., Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet. Report of a workshop, 5-6 October 1999, Paris, France. *Food Chem Toxicol*, 2001. **39**(9): p. 893-905.

228. Potter, J.D., *Colorectal cancer: molecules and populations*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(11): p. 916-32.
229. Insinga, A., S. Minucci, and P.G. Pelicci, *Mechanisms of selective anticancer action of histone deacetylase inhibitors*. Cell Cycle, 2005. **4**(6): p. 741-3.
230. Schaeferhenrich, A., et al., Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. Food Chem Toxicol, 2003. **41**(5): p. 655-64.
231. Spurbeck, J.L., et al., *Dynamics of chromosome spreading*. Am J Med Genet, 1996. **61**(4): p. 387-93.
232. Liehr, T. and B. Rautenstrauss, Regional localization of rat peripheral myelin protein 22 (Pmp22) gene to chromosome 10q22 by FISH. Mamm Genome, 1995. **6**(7): p. 489.

8. ANHANG I

(Methoden und Protokolle)

BESCHREIBUNG DER ZELLINIEN

HT29clone19A

Bereits 1964 wurde von Fogh und Trempe [123] die parentale HT29 Zelllinie aus dem Kolontumor einer 44 Jahre alten Patientin etabliert. Diese permanenten und undifferenzierten humanen Kolonkarzinomzellen stellen ein sehr spätes Stadium der kolorektalen Karzinogenese dar. Augeron und Laboisie isolierten 1984 aus diesen Zellen durch eine Behandlung mit 5 mM Natriumbutyrat einen Zellklon, welcher den rückdifferenzierten HT29 Zellen entsprach und mit HT29clone19A bezeichnet wurde. Eine nähere Beschreibung des tatsächlichen Differenzierungsgrades lag nicht vor. Unter standardisierten Zellkulturbedingungen wachsen die HT29clone19A Zellen adhärent in mehreren Schichten mit einer Generationszeit von 24 Stunden. Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurden subkonfluent (80% Konfluenz) gewachsene Zellen in Monolayer verwendet. Die HT29clone19A Zellen sind als in vitro Modell der kolorektalen Karzinogenese für die Untersuchung molekularer Mechanismen von großer Bedeutung, weisen aber wie ihre Stammzelllinie HT29 einen polyploiden Chromosomensatz mit einem wahrscheinlich stabilen, aber hoch aberranten Karyotyp auf [124-126].

LT97 Adenomzellen

Als genetisch bedingte und vererbare Formen machen die Familiäre Adenomatöse Poliposis (FAP) und das nichtpolipöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC) zusammen 4-6 % der Kolontumore aus [228]. Die im Jahre 2002 von *RICHTER ET AL.* isolierten und etablierten LT97 Zellen stammen aus dem kolorektalen Mikroadenom einer 47-jährigen FAP-Patientin und repräsentieren eine permanente Adenomzelllinie epithelialen Ursprungs [127-128]. Ihr gutartiger Genotyp ist durch einen Verlust der Heterozygotie (LOH) beider Allele des *APC*-Tumorsuppressorgens und durch ein mutiertes *K-Ras* Onkogen gekennzeichnet. Er entspricht dem Stadium eines frühen Adenoms, weshalb die Zelllinie ein geeignetes Modellsystem für primär-ähnliche Kolonzellen darstellt.

Morphologisch zeichnen sie sich durch eine langgestreckte Form und ein dreidimensionales Wachstum aus. In Zellaggregaten von 5-10 Zellen wachsen die Zellen exponentiell in einem serumhaltigen Kulturmedium, welches mit verschiedenen Wachstumsfaktoren wie TGF α , EGF, Insulin und HGF supplementiert wurde. Darüber hinaus besitzen die LT97 Zellen trotz ihrer starken Abhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren eine autokrine TGF α -Sekretion

zur eigenen Wachstumsförderung. Die Zusammensetzung des Grundmediums inklusive aller benötigten Zusätze können dem Materialteil entnommen werden [127, 229].

ZELLPRÄPARATION ZUR UNTERSUCHUNG DER ZYTOTOXIZITÄT

Für die Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung aller 2ACB über 120 min wurden subkonfluent gewachsene Zellen (HT29clone19A, LT97) verwendet. Nur für HT29clone19A war eine definierte Aussaat von 10×10^6 Zellen möglich. Jeweils einen Tag vor der Ernte erhielten die Zellkulturen frisches Medium. Für die Untersuchungen mit primären Kolonzellen wurde das sofort nach Entnahme und noch während der Operation bereitgestellte Kolongewebe nach der Methode der „perfusion-supported mechanical disaggregation“ bis zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet [230]. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden so aliquotiert, dass innerhalb eines Versuchsansatzes jeweils zwei der Testsubstanzen eingesetzt werden konnten. Dabei wurden nur eine RPMI-, eine EtOH- sowie eine 4-HNE-Positivkontrolle (PK II, 150 μ M) mitgeführt.

ZELLPRÄPARATION ZUR UNTERSUCHUNG DER GENOTOXIZITÄT

Grundsätzlich erfolgte die Präparation der Zellen analog der Zellpräparation zur Untersuchung der Zytotoxizität. Die Arbeiten mit LT97 Zellen erforderten jedoch mehr Zellmaterial, weshalb teilweise die Zellsuspensionen zweier Zellkulturflaschen (75 cm²) vereinigt und in einem Versuch verwendet wurden. Nach der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte die Aliquotierung der Zellen so, dass gegebenenfalls zwei Testsubstanzen parallel in einem Comet Test mit zwei einzelnen Elektrophoresen untersucht werden konnten (doppelter Probenansatz). In späteren Versuchsansätzen mit zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde jeweils nur ein Cyclobutanon eingesetzt. Die Elektrophorese der Zellen, welche für 60 min inkubiert wurden, erfolgte getrennt von jenen Zellen, welche nur 30 min behandelt wurden.

Da die Ergebnisse der bereits untersuchten 2ACB in HT29clone19A und primären humanen Kolonzellen keine dosisabhängige Wirkung im niedrigeren Konzentrationsbereich erkennen ließen, wurde auf die Konzentrationen 200 und 250 μ M verzichtet.

ZELLPRÄPARATION ZUM NACHWEIS KLASTOGENER EFFEKTE VON 2-DODECYLCYCLOBUTANON IN PROLIFERIERENDEN LT97 ADENOMZELLEN MITTELS FLUORESCENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG

Gewinnung der Chromosomen - Metaphasenpräparation

In einem Zeitraum von 90-120 min vor der Ernte der Zellen wurden diese mit frischem Kulturmedium versetzt, welchem zuvor die Colcemid-Stammlösung in einer Verdünnung von 1:10 zugegeben wurde. Colcemid, ein Derivat des Alkaloids Colchicin, wird aus Colchium

autumnales gewonnen und wirkt als Spindelgift. Es verhindert den Aufbau des Spindelapparates, wodurch die zum Zeitpunkt der Colcemidbehandlung in der Teilungsphase befindlichen Zellen im Metaphasestadium arretieren. Die Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung überführt die Zellen und Zellkompartimente in einen Quellungszustand, wodurch es zur Vergrößerung und Auflockerung der Anordnung der einzelnen Organellen kommt. Durch die Zugabe von Fixativ (1 Teil Eisessig, 3 Teile Methanol) wird dieser Effekt noch verstärkt. Die chromosomalen Strukturen im Zellkern werden freigelegt und dadurch im Hellfeld- und im Phasenkontrast mikroskopisch sichtbar [148].

Die Zellen wurden geerntet und nach Gewinnung der Pellets mit 10 ml 37°C warmer hypotoner Lösung versetzt und kräftig aufgeschüttelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Suspension für 15 bis 19 min bei 37°C im Wasserbad. Nach der Zugabe von 1 ml eisgekühltem Fixativ und kräftigem Schütteln wurde die Suspension für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte in jeweils 10 ml Fixativ, bevor die Zellen in 1 ml Fixativ aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurden.

Objektträgerpräparation für die FISH

Die mit Seidenpapier gereinigten OT wurden vor der Verwendung in Aqua dest. bei 4°C aufbewahrt. Eine feuchte Kammer wurde auf ca. 60°C vorgewärmt. Das entstehende Mikroklima schaffte so die für die folgenden Schritte notwendige erhöhte Luftfeuchtigkeit [231]. Auf die schräg in die Kammer platzierten OT wurde die in Fixativ aufbewahrte Zellsuspension aufgetropft und nach einer kurzen Antrocknungsphase wurde Fixativ nachgetropft, um eine bessere Haftung der Zellen zu bewirken. Während das Methanol verdunstet, wirkt die Essigsäure stark hygroskopisch und führt dazu, dass Wasserdampf aus der Atmosphäre aufgenommen wird. Die daraus folgende Quellung der Chromosomen ermöglicht deren Sichtbarmachung. Im Anschluss an die Dehydrierung der OT in einer aufsteigenden Ethanol (EtOH)-Reihe (70% → 95% → 100%) erfolgte die Alterung der OT für 1 Woche bei RT. Für eine langfristige Aufbewahrung konnten die OT bei -20°C gelagert werden.

24-Farben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Eine erfolgreiche Hybridisierung setzt ein möglichst plasmafreies Präparat voraus. Durch den Einsatz Protein-verdauender Enzyme wie Pepsin, Trypsin oder Proteinase K wurde die Durchlässigkeit des Plasmas für die Sonden-DNA erhöht und zugleich die Hintergrundfärbung reduziert. Die Postfixierung diente der Stabilisierung der Chromosomen auf dem Objektträger, um ein Ablösen zu verhindern. An die obligatorische Formamid-Hitzedenaturierung der chromosomalen DNA auf dem OT sowie der DNA-Sonde zur Destabilisierung der DNA-

Doppelstränge schloss sich die konventionelle Hybridisierung der markierten Probe mit dem Untersuchungsmaterial in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht an.

Pepsinverdau

Zunächst wurden die Metaphase- und Interphasekerne umgebenden zytoplasmatischen Bestandteile der gealterten Proben in einem pepsinhaltigen Säurebad verdaut. Hierfür wurden 500 µl Pepsin in 100 ml, 37°C warme, 0,2 N HCL-Lösung (1%) gegeben und die OT für 5 min bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch einen Waschschrift in 1x PBS bei RT für 5 min beendet. Es folgte eine Postfixierung der Chromosomen durch eine Überschichtung der Präparate mit 100 µl einer 1%-igen Formaldehydlösung für weitere 10 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift in 1x PBS wurden die Proben in einer aufsteigenden EtOH-Reihe für je 3 min dehydriert und anschließend luftgetrocknet [232].

Denaturierung der Ziel-DNA

Die Denaturierung der Präparate erfolgte mit 100 µl 70%-igem Formamid bei 72°C auf der Heizplatte für 3 min. Um eine Renaturierung der Einzelstränge zu verhindern, erfolgte der erste Schritt der Dehydrierung in aufsteigender EtOH-Reihe in -20°C kaltem 70%-igen EtOH für 3 min. Die Dehydrierung wurde bei RT fortgesetzt. Die OTs wurden bei RT luftgetrocknet.

Denaturierung der Sonden-DNA

Die Sonden-DNA wurde durch einen Prähybridisierungsschritt mit COT-1 DNA vorhybridisiert. Bei diesem Schritt blockt COT-1-DNA repetitive Sequenzen in der Sonden-DNA, die nicht hybridisieren sollen, ab, wodurch unspezifische Hintergrundsignale vermieden werden. (COT-1 ist eine Fraktion genomischer DNA, in der hochrepetitive Sequenzen durch eine bestimmte Aufarbeitung angereichert sind [57].

MCB / wcp / pcg / BAC – Sonden

5 µl Sonde, 7 µl DS und 5-10 ng COT-1 wurden nach dem PREHYB-Protokoll denaturiert. Die mit Biotin markierte pcg 17p-Sonde wurde zusammen mit der entsprechenden Menge COT-1-DNA (5-10 ng) vorhybridisiert:

„PREHYB“-Protokoll:

Schritt 1: 75°C 5 min (Denaturierung)

Schritt 2: 4°C 2 min (Prähybridisierung)

Schritt 3: 37°C 30 min

Entwaschung und Detektion

Zur Entfernung ungebundener Probe wurden die DG vorsichtig von den OT entfernt und die OT wie folgt gewaschen:

Long-Wash-Verfahren (wcp-Sonden):

42°C Formamid 50% 5 min (3x)

42°C 2x SSC 5 min (3x)

RT 4x SSCT 1 min

Der Nachweis der gebundenen DNA-Sonden erfolgte durch Fluorochrom-markierte Zweitreagenzien. Hierfür wurden im Anschluss an die Waschung 100 µl SSCTM auf das Präparat gegeben, um abgedeckt mit einem DG in einer feuchten Kammer bei 37°C innerhalb von 15 min die unspezifischen Bindungsstellen für die bei der Detektion verwendeten Antikörper abzublocken. Danach wurde das DG entfernt und das Präparat wiederholt kurz in 4x SSCT gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Antikörper-Lösung aufgetragen und für 40 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Um allen 24 Chromosomen ein spezifisches Farbspektrum zu verleihen, wurde die kombinatorische Markierungstechnik angewendet. 24 verschiedene Schemata zu Markierung der Chromosomen mit den Fluorochromen Texas Red, SpectrumOrange, SpectrumGreen, CY5 und Cy5.5 ermöglichen so die eindeutige Detektion der einzelnen Chromosomen. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-bindenden Fluorochrom DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) gegengefärbt.

Detektionssysteme

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden die lyophilisierten Antikörper nach Herstellerangaben in SSCTM verdünnt. Nach dem letzten Detektionsschritt wurde einmal in 4x SSCT für 5 min und zweimal in 1x PBS, für jeweils 5 min gewaschen. Die dehydrierten OT wurden unter Lichtausschluss getrocknet und anschließend mit 20 µl DAPI/Antifade angefärbt und mit einem DG abgedeckt.

Auswertung

Es folgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung am Axioplan 2 mit einem Fünffachfilterrad für die aufeinander folgende Betrachtung der Färbungen mit DAPI, FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy 5 und Cy 5.5 bzw. DEAC. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Standard-CCD Videokamera gekoppelt mit der ISIS digital FISH Imaging Systems-Software (Metasystems, Altlusheim, Deutschland). Die Auswertung berücksichtigte numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, besonders im Hinblick auf die relevanten Chromosomen 5, 12, 17 und 18.

2-FARBEN-FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG

Denaturierung der Sonden-DNA

Die mit Biotin markierte pcp 17p-Sonde wurde zusammen mit der entsprechenden Menge COT-1-DNA (5-10 ng) vorhybridisiert:

„PREHYB“-Protokoll:

Schritt 1: 75°C 5 min (Denaturierung)

Schritt 2: 4°C 2 min (Prähybridisierung)

Schritt 3: 37°C 30 min

Die direkt markierte p53- (auch 17p13) Sonde wurde vor Gebrauch in Hybridisierungspuffer (CEP Hybridization Buffer) der Firma Vysis bei 72°C denaturiert:

„DIREKT“-Protokoll:

Schritt 1: 72°C 5 min (Denaturierung)

Schritt 2: 4°C bis zur Entnahme der Proben aus dem Cyclor

Parallel zur Vorbereitung der Sonden auf die Hybridisierung wurde die zuvor auf Objektträger aufgebraachte Ziel-DNA durch 70%-iges Formamid bei 72°C denaturiert und in aufsteigender EtOH-Reihe, beginnend mit -20°C kaltem 70%-igen Ethanol, dehydriert. Die Sonden wurden vereinigt und auf die Metaphase-Objektträger aufgebracht. Es erfolgte eine Hybridisierung über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C unter Luftabschluss.

Entwaschung und Detektion

Zur Entfernung ungebundener Probe wurden die DG von den OT entfernt und diese nach der Long-Wash-Methode (wcp-Sonden) entwaschen. Die Detektion der biotin-markierten 17p Sonde erfolgte über Streptavidin-FITC (Fluoreszeinisothiocyanat). Nach der Detektion wurde die Gesamt-DNA mit DAPI, gelöst in Vecta Shield, gegengefärbt und die Probe mikroskopisch ausgewertet. Hierfür wurden mindestens 50 Metaphasen über eine Software-gesteuerte CCD-Farbkamera aufgenommen. Die Aberrationen wie Verlust (Deletion), Verlagerung/Austausch (Translokation) oder Zugewinn (Duplikation) des markierten genetischen Materials sowie Chromatidbrüche wurden dokumentiert und graphisch dargestellt.

ERGEBNISSE

Bestimmung der akuten Zytotoxizität der Kontrollen in den verschiedenen Kolonzelltypen mittels Trypanblau-Ausschlusstest

Zur Ergänzung und zum Nachweis, dass der Versuch gelungen war, wurden in jedem Versuchsansatz eine unbehandelte Kontrolle (UK, RPMI), eine Negativ- oder Lösungsmittelkontrolle (0) und zwei Positivkontrollen (PK, 100, 150 μ M 4-HNE) mitgeführt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen grafisch dargestellt. Oben rechts werden die Versuchsreihen benannt, zu welchen diese Kontrollen gehörten.

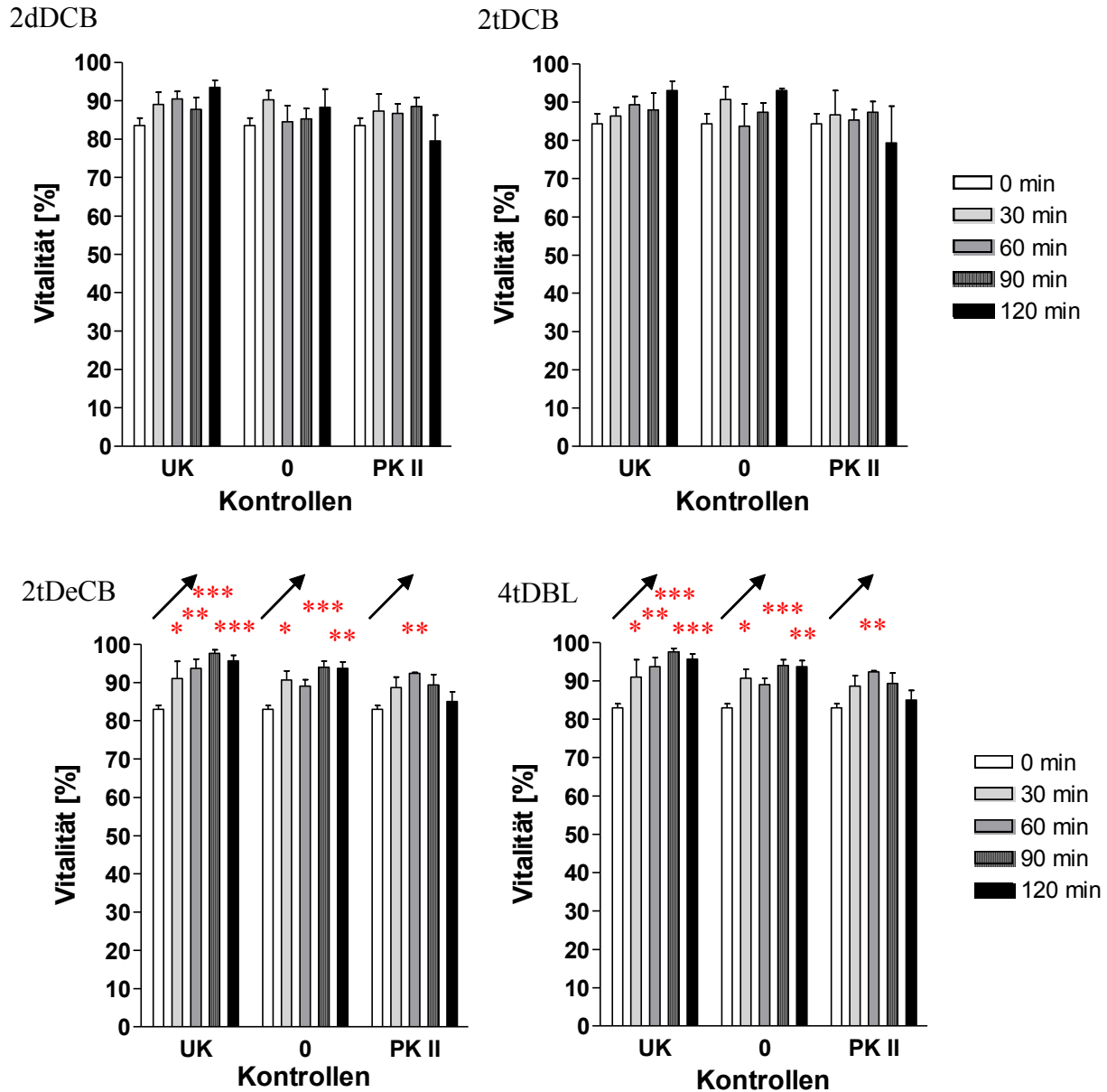


Abbildung 52: Übersicht über das Verhalten der Kontrollzellen (HT29clone19A), welche zusätzlich zu den 2ACB zeitgleich mit RPMI 1640-Medium (unbehandelte Kontrolle, UK) und 150 μ M 4-HNE (Positivkontrolle, PK II) inkubiert wurden.

Die statistisch signifikanten Veränderungen der Vitalität gegenüber der Ausgangsvitalität (0 min) in Abhängigkeit von der Zeit entsprechen * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Insgesamt waren die Kontrollen nicht zytotoxisch. Jedoch zeigte sich in den Ansätzen mit 2tDeCB und 4tDCB eine signifikant höhere Vitalität der behandelten Zellen.

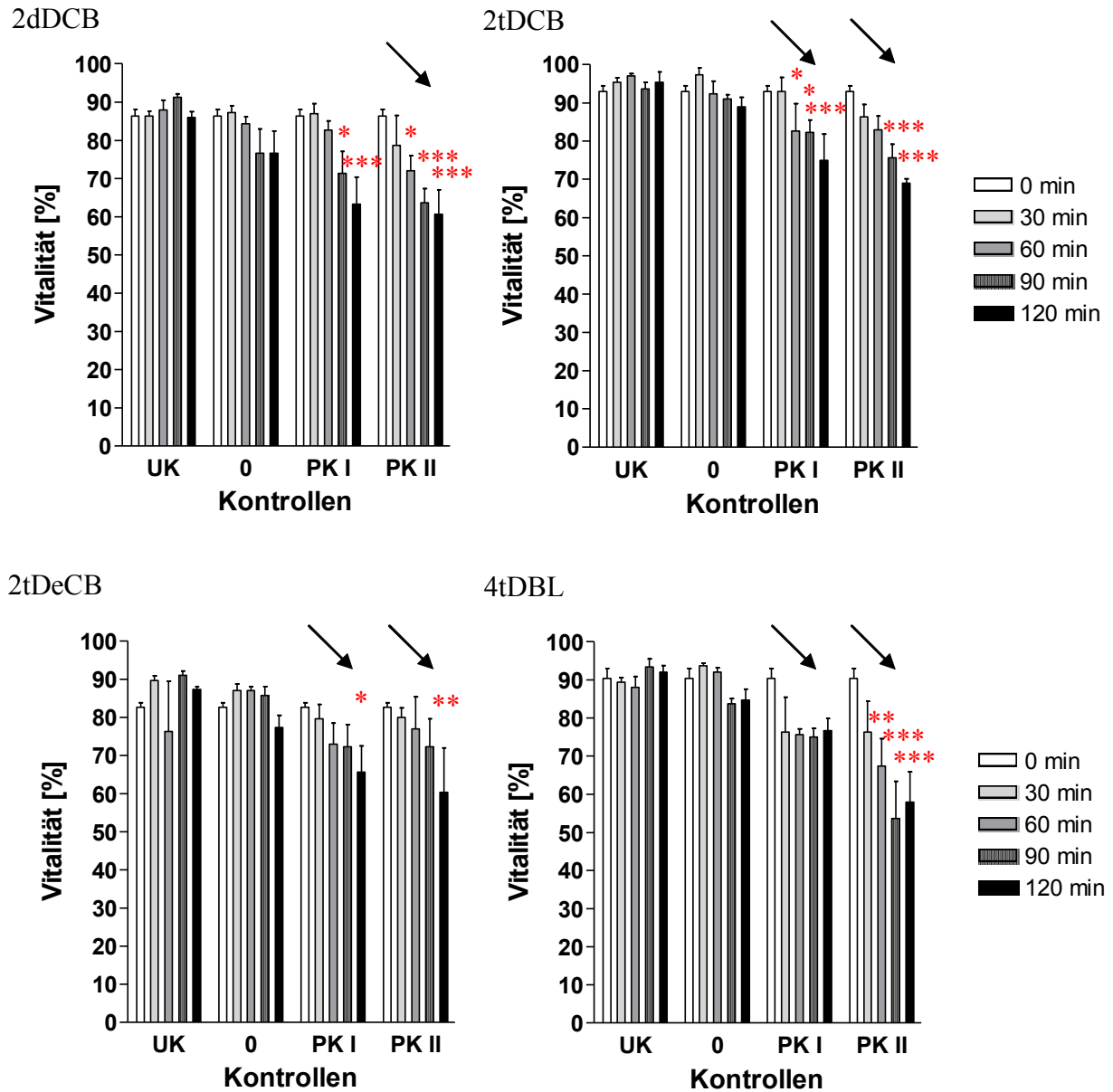


Abbildung 53: Übersicht über das Verhalten der Kontrollzellen (LT97), welche zusätzlich zu den 2ACBs zeitgleich mit RPMI 1640-Medium (unbehandelte Kontrolle, UK) sowie 100 und 150 µM 4-HNE (Positivkontrolle, PK I + II) inkubiert wurden.

Die statistisch signifikanten Veränderungen der Vitalität gegenüber der Ausgangsvitalität (0 min) in Abhängigkeit von der Zeit entsprechen * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die Positivkontrollen zeigten eine signifikante Zytotoxizität in den LT97 Zellen. Die EtOH-Kontrolle hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

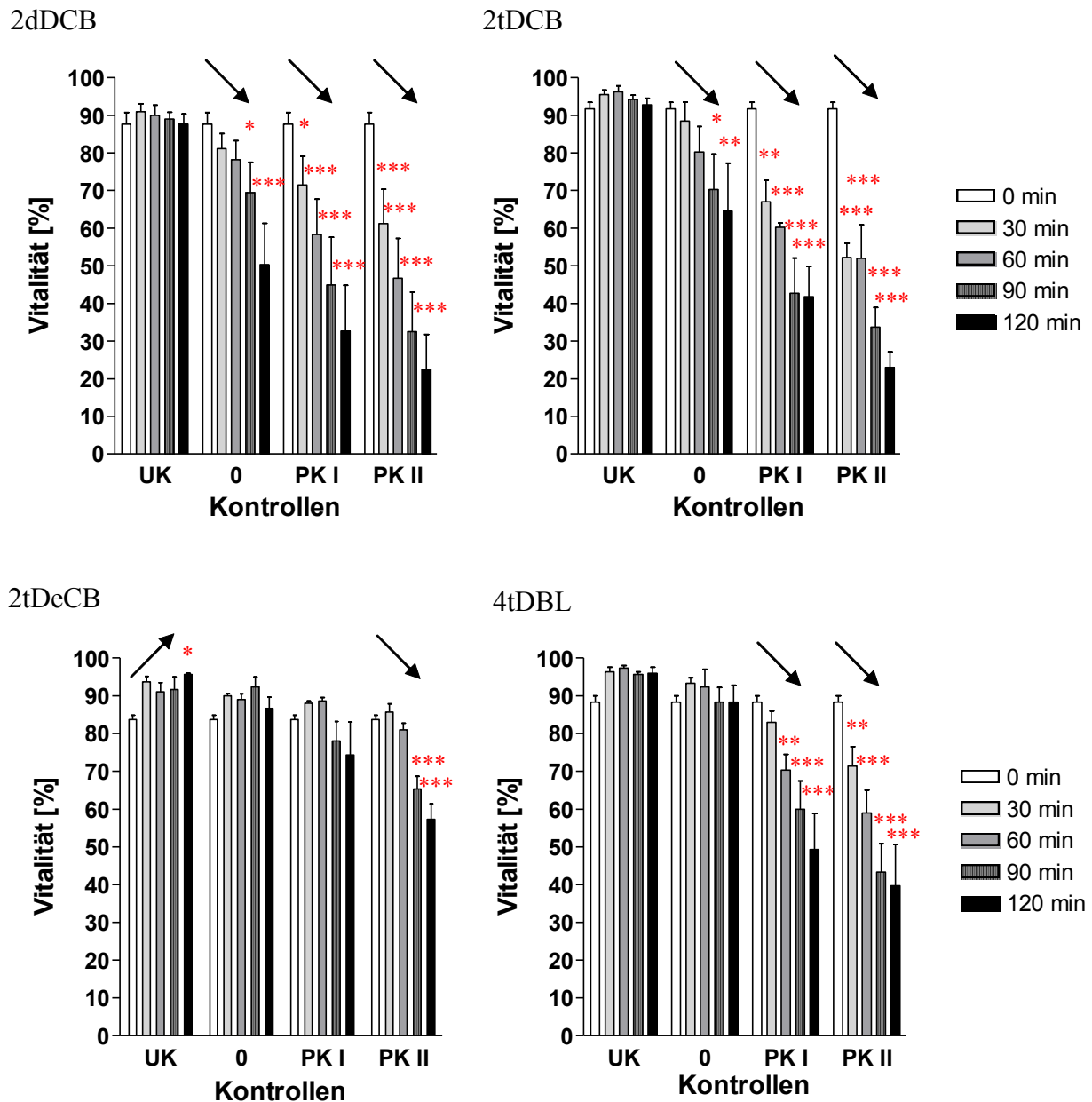


Abbildung 54: Übersicht über das Verhalten der Kontrollzellen (Primärzellen), welche zusätzlich zu den 2ACBs zeitgleich mit RPMI 1640-Medium (unbehandelte Kontrolle, UK) sowie 100 und 150 μM 4-HNE (Positivkontrolle, PK I + II) inkubiert wurden.

Die statistisch signifikanten Veränderungen der Vitalität gegenüber der Ausgangsvitalität (0 min) in Abhängigkeit von der Zeit entsprechen * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Auch in den primären Kolonepithelzellen wirkten 4-HNE stark zytotoxisch. Die EtOH-Kontrolle hatte einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Daher erfolgte vor der Berechnung der EC_{50} -Werte eine Normalisierung der Daten, bezogen auf die EtOH-Kontrolle.

Tabelle 4: Zytotoxizität (angeg. als Vitalität in % der Kontrolle) von 2dDCB in LT97 und primären Kolonzellen nach Normalisierung auf die Lösungsmittelkontrolle (Grundlage für Berechnung der EC₅₀ Werte)

Konzentration	Zeit (min)				
<i>LT97 (n=3)</i>	0	30	60	90	120
0	100	100	100	100	100
150	98	102	87	81	55
300	98	100	86	50	46
600	98	94	82	58	49
1049	98	92	78	45	34
2097	98	97	76	45	23
<i>Primärzellen(n=6)</i>					
0	100	100	100	100	100
150	100	95	84	49	36
300	100	82	66	39	22
600	100	86	62	27	21
1049	100	73	58	36	18
2097	100	84	55	20	15

Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 2-Alkylcyclobutanone und das Lakton in Kolonzelltypen verschiedener Transformationsstadien

Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge von EtOH und 2dDCB

In HT29clone19A Zellen erzeugten EtOH und 4-HNE DNA-Strangbrüche. Die Abb. 65 zeigt die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch das Lösungsmittel EtOH und durch die Positivkontrolle 4-HNE sowie durch 2dDCB im Überblick. In Tab. 6 sind die Vitalitäten der Zellen nach der Inkubation gegenübergestellt. Die Schädigung wurde im Eppendorf-Reaktionsgefäß (n=3) durchgeführt. Der Einfluss von EtOH wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0) mittels einer One-way ANOVA in Kombination mit dem Dunnett's post-hoc-test überprüft. Die statistische Überprüfung der 2dDCB-induzierten DNA-Schäden erfolgte gegen die jeweilige EtOH-Konzentration mittels einer Two-way ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni post-hoc-test. Dabei wurden die Tail Intensities nach HNE (250 µM) mit 3,9% EtOH verglichen, nach 150 µM 2dDCB mit 0,29% EtOH, nach 200 µM 2dDCB mit steigendem EtOH-Gehalt.

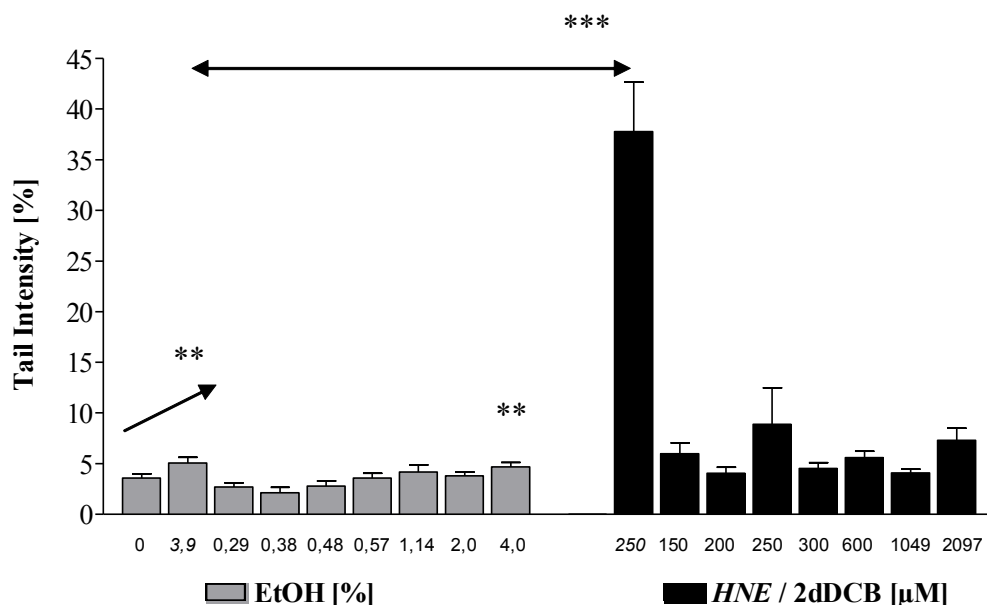


Abbildung 55: Vergleich der DNA-Strangbruchinduktion in HT29clone19A Zellen durch EtOH allein, durch 250 µM 4-HNE sowie durch 2dDCB mit unterschiedlichen EtOH-Anteilen nach 30 min im Comet Assay
Dargestellt sind die Tail Intensities in % [%] aus je 3 unabhängig voneinander reproduzierten Versuchen. [**p<0.01, ***p<0.001]

In Abb. 55 ist zu erkennen, dass EtOH im Vergleich zur unbehandelten Mediumkontrolle (0; TI=3,57±0,39%) ab einer Konzentration von 3,9% in HT29clone19A Zellen signifikant DNA-Schäden induzierte (TI=5,07±0,56%). Dahingegen verringerten sich die Schäden durch 0,29 und 0,38% EtOH signifikant (2,70±0,5% und 2,14±0,53%). Keinen Einfluss auf die DNA-Strangbruchrate zeigten 0,48-1,14% EtOH. Ob Zytotoxizität bei der Induktion von DNA-Schäden durch EtOH und 2dDCB eine Rolle spielt zeigen die Vitalitätsangaben in Tab. 6.

Tabelle 5: Vitalitäten nach 30-minütiger Behandlung von HT29clone19A Zellen mit EtOH, 4-HNE und 2dDCB im Vorversuch

EtOH				t-test EtOH vs. 0,	4-HNE / 2dDCB				2-way ANOVA TS vs. K,
[%]	Vitalität [%]	SEM	n	*p<0,05 **p<0,01	[µM]	Vitalität [%]	SEM	n	*p<0,05 **p<0,01
0	82,33	2,73	3						
3,9	77,00	3,06	3	n.s.	250	73,00	1,00	3	n.s.
0,29	86,00	-	1	n.m.	150	78,33	3,33	3	n.s.
0,38	79,00	-	1	n.m.	200	80,00	1,53	3	n.s.
0,48	76,00	-	1	n.m.	250	76,33	4,06	3	n.s.
0,57	77,00	-	1	n.m.	300	71,33	1,76	3	n.s.
1,14	84,00	-	1	n.m.	600	74,00	0,00	3	n.s.
2,0	81,67	2,85	3	n.s.	1049	72,67	3,71	3	n.s.
4,0	73,67	2,03	3	*	2097	56,67	1,86	3	**

0 = Mediumkontrolle, n.s. = nicht signifikant; n.m. = nicht möglich

Im Allgemeinen gilt eine DNA mit einer Tail Intensity von 3-5% als ungeschädigt. Die Daten zeigen jedoch die hohe Empfindlichkeit des Testsystems und somit, dass in HT29clone19A Zellen durch das Lösungsmittel EtOH geringe Schäden gesetzt werden, welche nicht höher als $5,07 \pm 0,56\%$ TI, jedoch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0, Mediumkontrolle) sind. Die Vitalität verringert sich durch EtOH zwar signifikant, erreicht aber nicht die 70%- Grenze, sodass das Einbringen der Zellen in das Comet Assay-Testsystem möglich ist. Dass EtOH unabhängig seiner Zytotoxizität DNA-Schäden induziert, zeigen die Werte nach 3,9%. Hier liegt die Vitalität bei 77% und ist gegenüber der Mediumkontrolle nicht signifikant verringert, wodurch der DNA-Schaden auf die genotoxische Wirkung des EtOH zurückzuführen ist. Werden die Zellen zusätzlich zu EtOH mit $2097 \mu\text{M}$ 2dDCB behandelt kommt es zu einer weiteren signifikanten Abnahme der Vitalität der Zellen im Vergleich zu 4% EtOH allein ($56,67 \pm 1,86\%$), was auf einen synergistischen Effekt hinweist.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der auf EtOH normalisierten Ergebnisse zur Genotoxizität von 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton und der faktoriellen Veränderung in Abhängigkeit von der Zeit in frisch isolierten primären Kolonepithelzellen nach 30 und 60 min im Comet Assay

Behandlung		30 min		60 min		Faktor der Veränderung 30 vs 60 min	2-way ANOVA 30 vs. 60 min
Testsubstanz	Konzentration	MW	SEM	MW	SEM		
RPMI 1640	UK	0,71	0,40	0,53	0,26	0,74	n.s
4-HNE, 100 μM	PK I	1,53	0,37	1,88	0,59	1,23	n.s
4-HNE, 150 μM	PK II	2,22	0,54	2,42	0,77	1,09	n.s
EtOH, 4 %	0	1,00	0,09	1,00	0,08	1,00	n.s
4tDBL [μM]	150	1,61	0,07	1,30	0,13	0,81	n.s
	300	1,71	0,26	1,99	0,23	1,17	n.s
	600	1,53	0,13	2,27	0,15	1,48	*p<0,05
	1049	1,45	0,09	2,41	0,29	1,66	**p<0,01
	1260	1,67	0,12	2,23	0,30	1,34	n.s

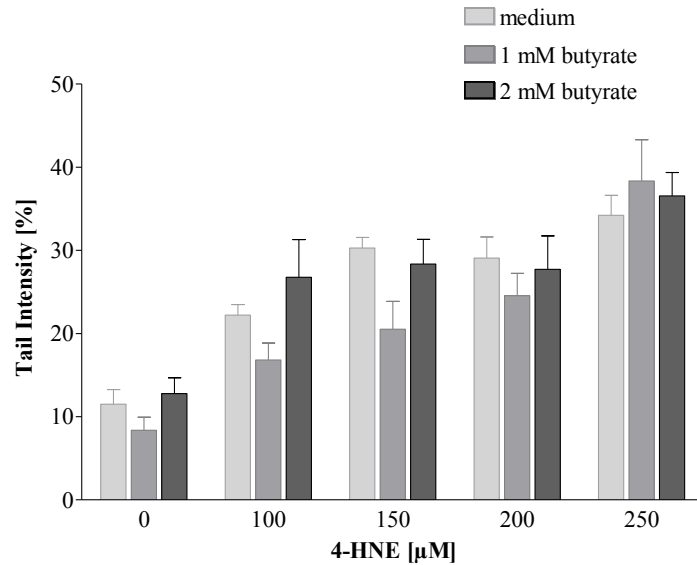


Abbildung 56: Induktion von DNA-Schäden im Comet Assay durch 4-HNE nach Vorbehandlung der LT97 Zellen mit Butyrat (1, 2 mM) für 24 Stunden [n=2].

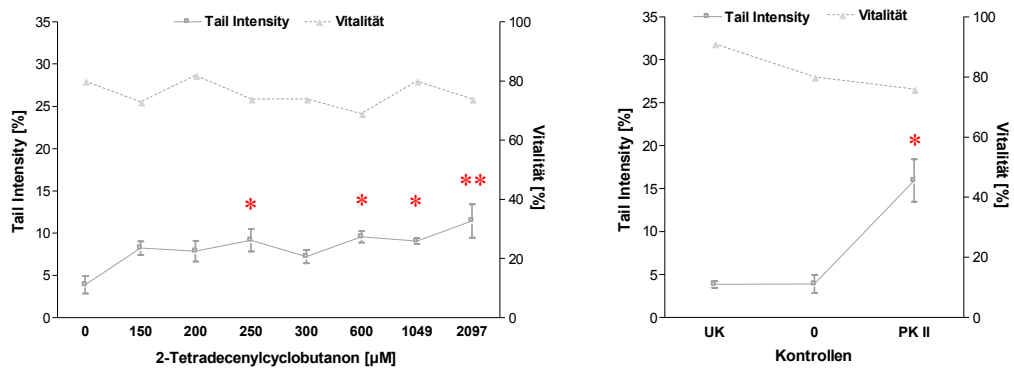


Abbildung 57: Genotoxizität von 2-Tetradecenylcyclobutanon (links) und der Kontrollen (rechts) in HT29clone19A Zellen nach 60 min (n=1) im Comet-Assay

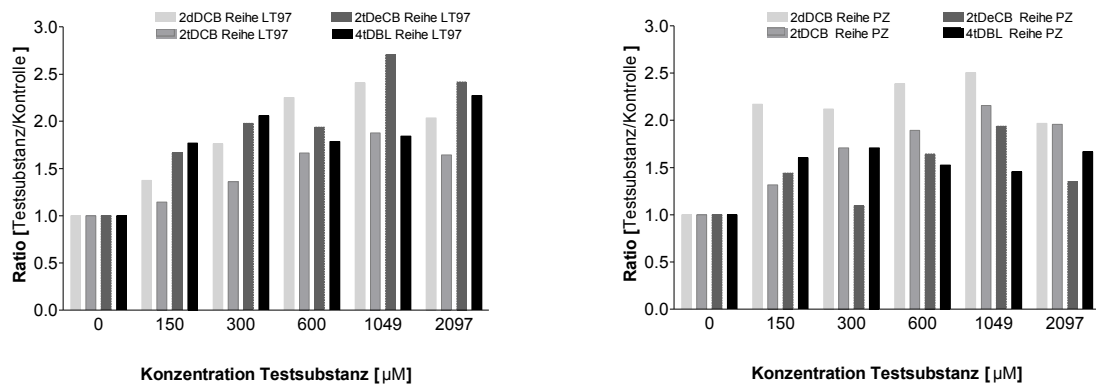


Abbildung 58: Gegenüberstellung der relativen DNA-Schädigung aller 2ACB und des Laktons in LT97 Zellen (links) und primären Kolonzzellen (rechts)

9. ANHANG II

Geräte

Analysenwaage (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Axioplan 2, Axiovert 25 + 100 Fluoreszenz-Mikroskope	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Bildauswertungssystem (KOMET 4.0)	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK
Brutschrank (Steri Cult 200)	Forma Scientific, Inc., USA
CCD-Videokamera	IMAC
Elektronikrührer (Monotherm variomag)	H+P Labortechnik GmbH, München
Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, horizontal	Biometra, Göttingen
Filtersätze (02; 09 und 15)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Fluoreszenzmikroskop (Axiolab HB50)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Inkubator	Selutec GmbH, Mössingen-Öschingen
Kamera (KPO-D50 Color Digital)	Hitachi Denshi, Ltd., Japan
Kamera (MicroMAX Digital CCD)	BFI OPTILAS GmbH, Puchheim
Konfokales Mikroskop (Axiovert M100)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kühlzentrifuge	Fisher Scientific, Schwerte
Laborbrenner (Gasprofi)	Wartewig Labor - und Dentaltechnik, Göttingen
Mikrowellengerät (HMT 700B)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, Münche
Minischüttler (MS 1)	IKA-Werke, Staufen
MTP-Fluoreszenz-Photometer (SpectralFluor Plus)	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
PTC-200 Gradienten Cycler	MJ Research
Schüttelwasserbad	GFL mbH, Burgwedel
Speed vac	Savant
Sterile Werkbank (Herasafe H12)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Thermomixer (Compact)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tischzentrifuge (CR 4.22)	Jouan GmbH, Hanau
Titan-Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin electronic GmbH&Co.KG, Berlin
Ultraschallbad (Ultracleaner Eltrosonic)	neoLab, Heidelberg
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UV-vis Spektrophotometer (CaryWin UV Bio)	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Wärmeplatte (HP 9060)	Labotect GmbH, Göttingen
Wasserbad	Memert GmbH & Co. KG, Schwalbach
Zentrifuge (biofuge pico; biofuge fresco)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Software

CaryWin UV Bio 2.0	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
CCD-Camera	Fujifilm LAS-1000, Diana, USA
Comet-Assay II 1.03	Perceptive Instruments, Halstead, UK
GraphPad PRISM® 4.0	GraphPad Software Incorporated, San Diego
ISIS 3 Software	MetaSystems GmbH, Altussheim
Microsoft Office 2000 und XP für Windows	Microsoft Corporation, USA

Chemikalien und Reagenzien

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
2-Dodecylcyclobutanon, 2-Tetradecylcyclobutanon, 2-Tetradecenylcyclobutanon, 4-Tetradecyl- γ -butyrolakton	Dr. Michel Miesch, Universität Strassburg,
4-Hydroxy-2-nonenal	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
4'6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Agarose, Sea Plaque GTG (low melting)	Biozym Diagnostics, Hameln
Agarose, SEAKEM HGT	Biozym Diagnostics, Hameln
Collagenase P [$> 1,5$ U/mg]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol, absolut, getrocknet	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glutathion-Assay-Kit	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Natrium-Lauroylsarcosinat	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Proteinase K (10 x PBD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypanblau (10 x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma-Aldrich, Steinheim bzw. Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

Arbeitsmittel

Deckgläser (24x24mm; 24x70 mm)	Menzel, Braunschweig
Einwegpipetten (2-50 ml)	Fisher Scientific, Schwerte
Einmalspritzen Soft-Ject (1 ml)/ Norm-Ject (5-10 ml)	Henke, Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Handstückzähler	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kanülen Sterican	B. Braun Medical AG, Emmenbrück
Mehrkanal-Luftpolsterpipette (Transferpipette)	Brand GmbH & Co., Wertheim

Mehrlochplatten (6-well; 96-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Objektträger, einseitig aufgeraut	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten (steril)	NeoLab, Heidelberg
Pipetten (Research, 1-2000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	Fisher Scientific, Schwerte
Pipettierhilfe (accu-jet)	Brand GmbH & Co, Wertheim
Präzisionsküvetten aus UV-Quarzglas	Hellma Optik GmbH, Jena
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Zellschaber, steril	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Zellzählkammer nach Neubauer (geeicht)	Fisher Scientific, Schwerte

Medien und Reagenzien

2dDCB, 2tDCB und 2tDeCB wurden direkt über Dr. Michel Miesch, Universität Strassburg, bezogen.

Zellkultur

Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep)

5000 U/ml Penicillin G in phys. Kochsalzlösung

5000 µg/ml Streptomycin-Sulfat in physiologischer Kochsalzlösung

Lagerung: -20°C

Trypsin-Versene-Lösung

3.1.11 ml 3.2. Trypsin [10 x] 25 g/l in phys. Kochsalzlösung

3.3.100 ml 3.4. Versen [1 x] 0,2 g/l in phys. Kochsalzlösung

L-15-Medium Leibovitz (+ Glutamin)

500 ml L-15-Medium Leibovitz
 5 ml Glutamin (200 mol/l)

Phosphate Buffered Saline (PBS)

8,0 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 0,2 g/l KH_2PO_4
 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 pH 7,3; autoklaviert

Phosphate Buffered Saline (PBS) + Ca^{2+} + Mg^{2+}

1 L PBS
 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 0,13 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
 pH 7,3; autoklaviert, sterilfiltriert

Phosphate Buffered Saline (PBS) + Na_2EDTA

1 L PBS+ Ca^{2+} + Mg^{2+}
 1,86 g/l Na_2EDTA
 pH 7,4; autoklaviert, sterilfiltriert

Phosphate Buffered Saline + 0,5% BSA (PBS/BSA)

1 L PBS+ Ca^{2+} + Mg^{2+}
 0,5% (v/v) Bovines Serum Albumin (BSA)
 pH 7,4; autoklaviert, sterilfiltriert

LT97-Kulturmedium

400 ml MCDB-Medium
 100 ml L-15-Medium Leibovitz (+ Glutamin)
 10 µg/ml Insulin
 2×10^{-10} mol/l Trijodthyronin
 2 µg/ml Transferrin
 1 µg/ml Hydrocortison
 5×10^{-9} mol/l Natriumselenit
 30 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 2% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)
 1% (v/v) PenStrep

HT29clone19A-Kulturmedium

450 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4500 mg Glucose/L (DMEM)
 1% (v/v) PenStrep
 10% (v/v) FCS

Epithelzellnachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz*Kulturmedium**Phosphate Buffered Saline (PBS)**Phosphate Buffered Saline + 0,5% BSA (PBS/BSA)*

Deckgläser 24 x 24 mm, autoklaviert
Eisessig
Methanol (MeOH)
Mikrotiterplatten

Primärantikörper

4,25 µl **Anti-Ber-EP4** [epitheliales Antigen/Ep-CAM], monoklonal Maus Anti-Human 1 µg/ml: 1:235 in 0,5% PBS/BSA
995,75 µl PBS/BSA
20 µl **Anti-FIB-1 AS02** [Thy-1/CD90-Antigen], fibroblastenspezifisch, monoklonal Maus Anti-Human 1 µg/ml; 1:50 in 0,5% PBS/BSA
980 µl PBS/BSA

Sekundärantikörper

IgG, [Cy3-markiert] polyklonal Ziege Anti-Maus

Serum

Normal Goat Serum

Glycerol in PBS

Chromosomenpräparation

Einmalpipetten (5, 10 ml)
Eppendorf-Reaktionsgefäße(safe lock)
kühlbare Tischzentrifuge (CR 4.22)
15 ml Reaktionsgefäße

LT97-Kulturmedium

Aqua dest.

Mit Seralpur DELTA hergestelltes Reinstwasser (entionisiert, organisch rein, partikelfrei), zusätzlich autoklaviert

Hypotone Lösung (50 %KCL, 50 % NaCl)

0,4 g Kaliumchlorid (KCl)
100 ml Aqua bidest., steril
0,4 g Natriumchlorid (NaCl)
100 ml Aqua bidest., steril

Fixativ (1:4)

9 ml Methanol
3 ml Eisessig

Colcemidlösung (1:10)

1 ml Stammlösung mit 10 µg/ml
9 ml LT97-Kulturmedium

Metaphasenpräparation

Ethanol
Inkubationskammer/Objektträgerbox
Objektträger Superfrost Color

Pipettenspitzen
Seidenpapier

Vorbereitung der Metaphasechromosomen auf die FISH

Pepsinverdau und Postfixierung

MgCl₂ (1 M)

Pepsin-Stammlösung (0,5 %)

1g	Pepsin
50 ml	Aqua dest.

Pepsin-Säurebad

500 µl	Pepsin-Stammlösung (0,5%)
100 ml	0,2 N HCL-Lösung (1%)

PBS(1x)

9,55g/l	PBS Dulbecco in Aqua dest.
---------	----------------------------

Paraformaldehyd-Lösung

1%	Formaldehyd in 1x PBS
----	-----------------------

Postfixationslösung (1 % Formaldehyd)

50%	Paraformaldehyd-Lösung
5%	1 M MgCl ₂ in 1x PBS

Denaturierung

Formamid 70 %

70%	Formamid
	2x SSC in Aqua dest.

pH 7,0 mit 1 N HCL einstellen

COT-1 DNA (5 ng)

50 µl	COT-1 DNA (1 mg/ml)
100 µl	Ethanol, absolut

Eintrocknen in der Speed vac
Lagerung: -20°C

Prähybridisierung

Natriumphosphat (0,5 M)

500 ml	Na ₂ H ₂ PO ₄ (0,5 M)
500 ml	Na ₂ HPO ₄ (0,5 M)

pH 7,0 einstellen und zu 1 ml portionieren

20x SSC

87,65 g Natriumchlorid
44,10 g Natriumcitrat-Dihydrat
500 ml Aqua dest.
Autoklavieren oder als fertige Lösung erhältlich bei Gibco, BRL

Deionisiertes Formamid

2 g Resin-Kügelchen (Ionenaustauscher)
50 ml 100% Formamid
Für 3 h schütteln, filtrieren und bei -20°C lagern

Dextransulfat (DS)

2 g Dextransulfat
2 ml 20 x SSC
2 ml 0,5 M Natriumphosphat
5 ml deionisiertes Formamid
ad 10 ml Aqua dest. bei 70°C lösen (ca. 3h)

Entwaschung*Formamid 50 %*

50% Formamid
 2x SSC in Aqua dest.
pH 7,0 mit 1 N HCL einstellen

2x SSC

100 ml 20x SSC
900 ml Aqua dest, autoklaviert
pH 7,0 mit 1 N HCL einstellen

4x SSC

200 ml 20x SSC
800 ml Aqua dest, autoklaviert
pH 7,0 mit 1 N HCL einstellen

4x SSCT

0,05 Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)
 4x SSC
pH 7,0 mit 1 N HCL einstellen

Detektion

Deckgläser 24 x 60 mm

SSCTM

0,5 g Fettfreie Trockenmilch
10 ml 4 x SSCT

Auf dem Handschüttler mischen und anschließend bei 1500 rpm für 5 min zentrifugieren, nur den Überstand verwenden.

DAPI-Gebrauchslösung

1-2 µl 0,4% 4', 6- Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) Stocklösung: 50 µg/ml
ad 1 ml Vectashield Mounting Medium

Comet Assay

Deckgläser 24 x 24 mm
Deckgläser 24 x 70 mm
Metallbox (für Eiskühlung)
Objektträger (einseitig aufgeraut)

Normal-Melting-Agarose (0,5 %)

0,15 g Agarose, Seakem HGT (normal melting), NMA
30 ml PBS
Verwendung: 60°C

Low-Melting-Agarose (0,7 %)

0,21 g Agarose Sea Plaque GTG (low melting), LMA
30 ml PBS
Verwendung: 38°C

Lyse-Stammlösung

146,1 g/l NaCl 2,5 M
37,2 g/l Na₂EDTA, 100 mM
1,2 g/l Tris-Base, 10 mM
8 g/l mit NaOH pH 10 einstellen
10 g/l NaLauroylsarcosinat
pH 10; sterilfiltriert; Lagerung: RT

Tris-EDTA-Puffer

10 mmol/l Tris-HCl
1 mmol/l EDTA
pH 8,0; autoklaviert

Lyse-Gebrauchslösung

356 ml Lyse-Stammlösung
40 ml DMSO
4 ml TritonX-100
pH 10; 400 ml Lyselösung (für 20 OT) werden jeweils frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (alkalischer Comet-Assay)

30 ml/l NaOH-Stammlösung (10 mol/l; 10 N)
5 ml/l Na₂EDTA-Stammlösung (200 mmol/l)
H₂O ad 1l
pH 13; 2 l Elektrophoresepuffer (für 20 OT) werden jeweils frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Neutralisationspuffer (0,4 mol/l)

48,5 g/l Tris-Base; 0,4 mM
pH 7,5 mit konz. HCL eingestellt; steril filtriert und autoklaviert; Lagerung: RT

Detektion*DABCO-Antifade*

2,5 g DABCO
50 ml Tris-EDTA-Puffer
50 ml Glycerol
über Nacht rühren, Lagerung dunkel bei -20°C

SYBRGreen-Gebrauchslösung

10 µl SYBR[®] Green I[10.000 x]
10 ml DABCO-Antifade
Lagerung: dunkel bei -20°C

Glutathion Assay*BSO-Stammlösung (100 mM)*

22,23 g Buthioninsulfoximin
1 ml DMEM
Lagerung: 4°C (4 Wochen)

Glutathion-Stammlösung A (50x; 25 mM)

76,83 mg reduziertes Glutathion
10 ml MPA 5%
Lagerung: - 20°C Glutathion (reduziert)

Glutathion-Stammlösung B (0,5 mM)

200 µl Stammlösung A
9,8 ml MPA 5%
Vor Gebrauch frisch hergestellt.

Metaphosphorsäure-Stammlösung (5 %)

2,5 g Metaphosphorsäure (MPA)
50 ml Aqua bidest.
Vor Gebrauch frisch angesetzt.

Lösungen für die Bestimmung der GST- Gesamtaktivität nach HABIG ET AL.*CDNB-Stammlösung (20 mM)*

0,5 mg 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
10 ml Ethanol abs., unvergällt
unter Abzug pipettiert und im Ultraschallbad gelöst
Lagerung: 4 °G, luftdicht

CDNB-Gebrauchslösung (4 mM)

80% Phosphatpuffer (pH 6,5)
20% CDNB-Stammlösung (20 mM) in
 Ethanol abs.
vor jeder Messung frisch angesetzt

Phosphatpuffer 0,1 M

Lösung 1:
7,8 g NaH₂PO₄ (0,1 M)
500 ml Aqua bidest.
Lösung 2:
5,225 g K₂HPO₄ (0,1 M)
300 ml Aqua bidest.
Salze auf dem Magnetrührer vollständig gelöst unter Rühren pH 6,5 durch Titrieren der
Lösung 1 mit Lösung 2 eingestellt, autoklaviert
Lagerung: 4°C

Homogenisationspuffer(Stammlösung)

25 mM Tris-HCl
250 mM Saccharose
1 mM Na₂EDTA
pH 7,8; auf 4°C abgekühlt mit 1 N NaOH oder HCl eingestellt
Lagerung: - 20°C

Homogenisationspuffer mit Pefabloc (1 mM)

Zusätzlich: Pefabloc-Stammlösung 1%
Lagerung: 4°C (max. 6 Monate)

Pefabloc-Stammlösung (0,1 M)

24 mg Pefabloc
1 ml Homogenisationspuffer

Glutathion-Lösung (4 mM)

30,7 mg Glutathion
25 ml Phosphatpuffer (0,1 M)
Lagerung aliquotiert bei -20°C

Lösungen für die Proteinbestimmung nach BRADFORD***BRADFORD- Farbreagenz***

50 mg Coomassie Brilliant Blau G 0,01%
50 ml Phosphorsäure 1,6 mM
23,5 ml Ethanol 0,8 mM
dye reagent No.1 (nach *READ UND NORTHCOTE*; 1981)
unter Rühren mindestens 3 Stunden lösen und mit Aqua bidest. Auf 500 ml verdünnen
Lagerung: 4°C in abgedunkelter Flasche (einige Monate)

BSA-Stammlösung (1 %)

50 mg Bovine Serumalbumin (BSA)
5 ml H-Puffer mit Pefabloc (1 mM)
auf Magnetrührer gemischt, steril filtriert, aliquotiert, in autoklavierten safe Lock-
Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Jegliche aus anderen Quellen sinngemäß oder wörtlich übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl des Materials für die vorliegende Dissertationsschrift, speziell bei der Zusammenstellung der Ergebnisse, wurde ich von PD Dr. rer. nat. Michael Glei unterstützt. Es wurde von mir weder entgeltliche Hilfe von Promotionsberatern oder anderen Personen in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertationsschrift bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in wesentlichen Teilen ähnlicher Form als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht oder einer anderen Hochschule zur Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb eines akademischen Grades vorgelegt wurde. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

Jena, 27. August 2009

Nadine Knoll

Bedanken möchte ich mich...

...bei all jenen, die mir während meiner aktiven (und passiven) Zeit als Doktorandin am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie und danach die nötige Kraft und den Ehrgeiz gegeben haben, diese Arbeit durchzuführen und das wichtigste - sie auch zu vollenden!

Es galt nicht immer nur einfache Situationen zu meistern, aber Dank meiner Kollegen, und Freunde, welche ich in dieser Zeit sehr schätzen gelernt habe, war es jedoch nicht wirklich schwer sich den geforderten Aufgaben zu stellen.

Es war eine sehr schöne Zeit, die ich in Jena, am Institut für Ernährungswissenschaften erleben durfte, es war die, die mich geprägt und zu einem offenen und interessierten Menschen gemacht hat.

Daher gilt mein größter Dank posthum Frau Professor Dr. Beatrice Pool-Zobel. Sie schaffte es mich für das Fach der Ernährungstoxikologie zu begeistern und den Weg eines Promotiosstudiums mit all seinen Höhen und Tiefen einzuschlagen.

Bei Dr. Michael Glei bedanke ich mich recht herzlich für die professionelle und freundschaftliche Betreuung während dieser Zeit, die mich motiviert und das Zustandekommen dieser Arbeit und der damit verbundenen wissenschaftlichen Beiträge wesentlich beeinflusst hat. Vielen Dank auch für die Bereitschaft zur Diskussion meiner Ergebnisse und Gedanken.

Frau Edda Lösch und Eva Möller danke ich an dieser Stelle für ihre Flexibilität und das herzlich-kollegiale Miteinander, ohne welches das tägliche Arbeiten Seite an Seite, nicht möglich gewesen wäre.

Großen Dank schulde ich auch den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Zytogenetik und Karyotypevolution bzw. der Molekularen Zytogenetik vom Institut für Humangenetik und Anthropologie, namentlich Frau Dr. Anja Weise und Herrn Dr. Thomas Liehr, für die Einführung in die Methodik der Mehrfarben-FISH-Analyse und den unkomplizierten Umgang mit mir und meinen Fragestellungen. Ihre Expertise in der zytogenetischen Diagnostik ermöglichte mir erst die Durchführung der *in vitro* Untersuchungen zur Klastogenität und die daraus entstandenen wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

Meiner besten Freundin Natja danke ich für die vielen schönen gemeinsamen Jahre in Jena, die uns immer verbinden werden!

Denn: *Nur der wahre Freund erträgt dich wie du bist.* (nepalesisches Sprichwort, aus dem Terai)

Ich möchte auch Natjas geliebtem Marco danken, der mich oft aus brenzligen Situationen gerettet und unser gemeinsames Dasein in Jena mit seiner Persönlichkeit bereichert hat! Ihr Zwei seid einfach Klasse!

Ron „Kärni“ Kärner gilt meine aufrichtige Liebe und mein Dank. Ihm gehört mein Herz, er gibt meinem Leben den richtigen Rahmen und ein schönes Zuhause, ohne das die Vollendung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

LEBENS LAUF NADINE KNOLL**ANSTELLUNG**

seit 01.05.2006

Angestellte der Beckman Coulter GmbH**Verkausrepräsentantin im Bereich Durchflusszytometrie****PROMOTIONSSTUDIUM:**

06.07.2005 - 31.03.2006

Geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Humangenetik am Klinikum der FSU in Jena, Abteilung Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen (FISH) / Prä- und Postnatale Diagnostik*Thema:* Verifizierung von BAC-Array Daten mittels BAC FISH Technik

21.02.2005 - 30.06.2005

Praktikum mit anschließendem Forschungsaufenthalt am Lehrstuhl für Humangenetik am Klinikum der FSU in Jena, Abteilung Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen (FISH) / Prä- und Postnatale Diagnostik*Thema:* Methoden der Molekularen Genetik und Zytogenetik, speziell: 2-Farben-FISH-Analyse zur Untersuchung genspezifischer Veränderungen des Tumorsuppressorgens TP53 nach Behandlung humaner Adenomzellen des Kolons mit dem radiolytischen Fettsäurederivat 2-Dodecylcyclobutanon

01.02.2002 - 28.02.2005

Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Promotionsstudentin am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der FSU in Jena (voraussichtlicher Abschluss der Promotion im April/Mai 2006)*Thema:* Charakterisierung molekular-toxikologischer Wirkungen durch strukturanaloge 2-Alkylcyclobutanone an humanen Dickdarmzellen**DIPLOMARBEIT:**

10/2000 - 11/2002

Diplomandin am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der FSU in Jena*Thema:* Untersuchungen zur Hemmung des Glutathion / Glutathion S-Transferase - Systems in den humanen Darmtumorzellen HT29- Auswirkungen auf die Genotoxizität von 4-Hydroxy-2-nonenal**STUDIUM:**

09/1996 - 12/2001

Studentin der Diplom Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena (FSU)

Abschluss: Dipl.-Troph. (Uni)

SCHULBILDUNG:

09/1991 - 07/1996

Friedrich-Schiller-Gymnasium in Zeulenroda

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1984 - 07/1991

Friedrich-Schiller-Oberschule in Zeulenroda

PERSÖNLICHE DATEN:

Geburtstag:

18.01.1978

Geburtsort:

Zeulenroda / Thüringen

Staatsangehörigkeit:

deutsch

Familienstand:

ledig, keine Kinder

PUBLIKATIONEN

- a. **MUTATION RESEARCH. 6. SEPTEMBER 2005 [EPUB AHEAD OF PRINT]**
KNOLL ET AL.. 2005C:
2-Dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, is genotoxic in primary human colon cells and in cells from preneoplastic lesions
- b. **TOXICOLOGICAL SCIENCES. 86(1), 27–35 (2005)**
KNOLL ET AL. 2005B:
Genotoxicity of 4-Hydroxy-2-Nonenal in Human Colon Tumor Cells Is Associated with cellular Levels of Glutathione and the Modulation of Glutathione S-Transferase A4 Expression by Butyrate

POSTERBEITRÄGE

- a. **KNOLL ET AL. 2006:**
Application of fluorescence in-situ hybridisation (24-Color-FISH) for testing mutagenicity of ethylmethanesulphonate in preneoplastic human colon cells using the OECD guideline 473
Frühjahrstagung der Gesellschaft für Humangenetik, Heidelberg, März 2006
- b. **NAUNYN SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY: 2005**
FEB;371(1):R131/547§ 46
KNOLL ET AL. 2005A:
2-Dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, causes DNA strand breaks and chromosomal aberrations in human colon adenoma cells
Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2005
- c. **PROCEEDINGS OF THE GERMAN NUTRITION SOCIETY: PROC. GERM. NUTR. SOC., VOL 6 (2004)**
KNOLL ET AL. 2004:
In-vitro-Charakterisierung molekulartoxikologischer Eigenschaften von 2-Dodecylcyclobutanon in humanen Kolonzellen
41. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., München Freising-Weihenstephan, März 2004
- d. **NAUNYN SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY: 2003**
MAR;367(1):R165/648 (Publikation/ Posterabstract)
KNOLL N. AND POOL-ZOBEL BL. 2003:
2-Dodecylcyclobutanone, a contaminant formed during food irradiation, is non-genotoxic in the human colon tumor cell line HT29clone19A
20. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung e.V., Mainz, März 2003
- e. **KNOLL ET AL.. 2003:**
Glutathione S-transferase and Glutathione mediate the genotoxicity of 4-Hydroxy-2-nonenal in human colonocytes
First International Meeting of the HNE-Club: 4-Hydroxynonenal and related Lipid Peroxidation Products-Conference plus Practical Course
- f. **PROCEEDINGS OF THE GERMAN NUTRITION SOCIETY: PROC. GERM. NUTR. SOC., VOL 4 (2002) (Publikation/ Posterabstract)**
KNOLL ET AL. 2002:
Die Genotoxizität von 4-Hydroxynonenal ist abhängig vom Glutathion-/Glutathion S-Transferasen-Status
39. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V., Jena, März 2002